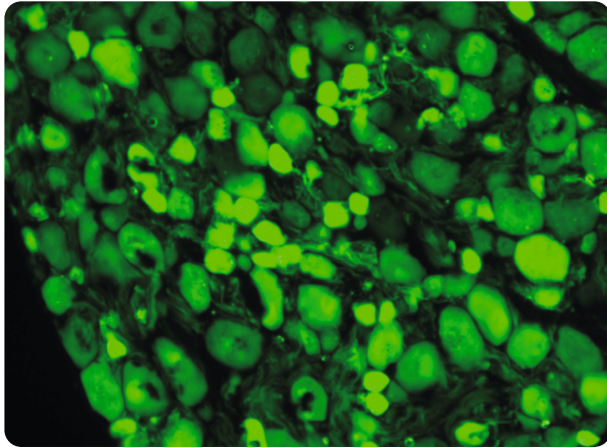


LARS WESSELS

Expression und Regulation des
Adrenomedullin-Signalwegs in
sympathischen paravertebralen
Ganglien der Maus



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Expression und Regulation des Adrenomedullin-
Signalwegs in sympathischen paravertebralen Ganglien
der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.
beim Fachbereich Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Lars Wessels
aus Wuppertal

Gießen 2016

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. E. Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: PD. Dr. Galuska

Tag der Disputation 07.12.2016

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht über die Anatomie und Physiologie sympathischer paravertebraler Ganglien	1
1.2	Transmitter an der Synapse im sympathischen Ganglion	3
1.3	Die Calcitonin-Peptidfamilie	5
1.4	Der Calcitonin-receptor-like-receptor (CLR)	11
1.5	Adaptationsmechanismen unter Hypoxie	13
1.6	Ziele der Arbeit	14
2	Materialien und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Chemikalien/Reagenzien	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Geräte	17
2.1.4	Gebrauchslösungen allgemein	18
2.1.5	Materialien für PCR, RNA-Isolation und cDNA-Synthese	19
2.1.6	Primärantikörper	20
2.1.7	Sekundärantikörper/-reagenzien	21
2.1.8	Software	21
2.1.9	Zellkulturmaterialien	22
2.1.10	Pharmaka	22
2.1.11	Sonstige Lösungen	23
2.2	Mausstämme	24
2.3	Methoden	25
2.3.1	Organgewinnung zur Immunhistochemie	25
2.3.2	Organgewinnung für PCR-Untersuchungen	25
2.3.3	Immunhistochemie	25
2.3.4	Reverse Transkription	28
2.3.5	Real-Time RT-PCR	29
2.3.6	Berechnung der relativen Expression	32
2.3.7	Nervenquetschungsversuche	34
2.3.8	Herstellung von Wholemoutpräparaten	34
2.3.9	Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in isolierten SCG-Zellen	34
2.3.10	Hypoxieversuche	35
2.3.11	Isolierung und Inkubation von entnommenen Ganglien	36
2.3.12	Elektrische Feldstimulation (EFS)	36
2.3.13	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37

3.1	Spezifitätskontrolle verwendeter Antikörper	37
3.2	Bestimmung der mRNA-Expression von AM und AM2/IMD in verschiedenen Organen	40
3.3	Messenger RNA-Expression von AM und AM2/IMD in verschiedenen Geweben nach einem Tag normobarer Hypoxie	44
3.4	Expression der CGRP-Peptidfamilie im SCG unter normobarer Hypoxie	50
3.5	Immunhistochemische Untersuchung der Expression der CGRP-Peptidfamilie, SCG	52
3.6	Expression direkt hypoxieregulierter Gene im SCG nach eintägiger Tierhaltung in normobarer Hypoxie	56
3.7	Beeinflussbarkeit der AM-Expression durch präganglionären Einfluss.	57
3.7.1	Basalexpression in Bl6-, M1 ^{-/-} und tabac-Mäusen	57
3.7.2	Versuche mit EFS zur Regulation von AM und AM2/IMD	59
3.8	Expression von AM in isolierten SCG nach pharmakologischer Stimulation	61
3.9	Effekt von AM auf den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Gabe von Nikotin in isolierten SCG-Neuronen	63
4	Diskussion	66
4.1	Verteilung von AM und AM2/IMD in verschiedenen Organen	66
4.2	Verteilung der Peptide der CGRP-Peptidfamilie im SCG	68
4.3	Wirkung der Peptide der CGRP-Peptidfamilie im SCG	70
4.4	Regulation der Peptide der CGRP-Peptidfamilie und des CLR-Rezeptorkomplexes unter Hypoxie	72
4.5	Der präganglionäre Einfluss auf die Expression von AM und AM2/IMD im SCG	75
4.6	Schlussfolgerung	78
5	Zusammenfassung	79
6	Abstract	80
7	Abkürzungsverzeichnis	81
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Tabellenverzeichnis	87
10	Literaturverzeichnis	88
11	Publikationsverzeichnis	100
12	Erklärung zur Dissertation	102
13	Danksagung	103
14	Lebenslauf	104

1 Einleitung

1.1 Übersicht über die Anatomie und Physiologie sympathischer paravertebraler Ganglien

Das autonome Nervensystem besteht aus drei Anteilen: dem Parasympathikus, dem enterischen Nervensystem und dem sympathischen Nervensystem. Diese drei Systeme sind essenziell, um die Körperfunktionen aufrecht zu erhalten und an unterschiedlichste Situationen anzupassen. Während das enterische Nervensystem die autonome Funktion des Gastrointestinaltraktes steuert, innerviert das parasympathische Nervensystem eine Vielzahl verschiedener Organe im ganzen Körper und ist somit an der Regulation verschiedenster Körperfunktionen beteiligt. Die größte Bandbreite in seinem Innervationsgebiet nimmt allerdings das sympathische Nervensystem ein, welches beinahe jedes Organ innerviert. Die Komplexität des Zusammenspiels der einzelnen Systeme lässt sich nicht in einem generellen Wirkmuster charakterisieren, sondern muss für jedes Organ gesondert betrachtet werden (Jänig & McLachlan 1992).

Das sympathische Nervensystem besteht sowohl aus zentralen als auch aus peripheren Anteilen. Die zerebralen Kerngebiete, die Einfluss auf die sympathische Aktivität nehmen, sitzen im Hypothalamus, vor allem im Nucleus paraventricularis sowie in der rostromedialen Medulla des Hirnstamms (Guyenet et al. 1996), aber auch neokortikale Anteile nehmen Einfluss (Westerhaus & Loewy 2001). Von diesen höheren Zentren projizieren absteigende Fasern auf präganglionäre Neurone im Nucleus intermediolateralis und im Nucleus intercalatus des Rückenmarks, welche nur in den spinalen Segmenten thorakale 1 bis lumbale 2 zu finden sind. Die Axone dieser Neurone verlassen das Rückenmark und ziehen als Ramus communicans albus vom Spinalnerv zu den paravertebralen sympathischen Ganglien. Von diesen makroskopisch als knotige Verdickungen zu erkennenden Strukturen gibt es beim Menschen drei zervikale [Ganglion (Ggl.) cervicale superius (SCG) medius und inferius], elf bis zwölf thorakale, vier lumbale, vier bis fünf sakrale und ein unpaarig angelegtes Ggl. impar, unmittelbar ventral des Steißbeins. Das untere zervikale und das oberste thorakale sympathische Ggl. sind als Ggl. cervicothoracicum oder auch Ggl. stellatum verschmolzen.

In sympathischen Ganglien liegen die multipolaren, postganglionären Neurone, mit welchen die Axone der präganglionären Neuronen Synapsen ausbilden. Die Axone der postganglionären Neurone, die meist unverzweigt sind, verlaufen mit einem Ramus communicans griseus zurück zum Spinalnerv, wo sich die sympathischen Fasern an andere Nervenstränge anlagern um dann als Teil eines Nerven zu Haut, Muskeln und Gefäßen zu

ziehen. Diese Gliederung gilt nur für die sympathischen Efferenzen mit Projektion zur Leibeswand (McLachlan 1974). Der zervikale Anteil bildet mit den verbleibenden Axonen den Plexus caroticus zur Innervation der zerebralen Gefäße und die Nervi cardiales cervicales zur Innervation des Herzens. Somit erfolgt die sympathische Innervation des Kopfes in erster Linie durch die Neurone des SCG. Die sympathische Innervation des Herzens entspringt zum größten Teil dem Ganglion stellatum und den weiteren Thorakalganglien (Chapman & Kinsey 1948). Die Innervation der anderen Organe der Brust- und Bauchhöhle erfolgt entsprechend durch Neurone der einzelnen segmentalen paravertebralen Ganglien (Langley 1904).

1.2 Transmitter an der Synapse im sympathischen Ganglion

Der Haupttransmitter an der Synapse im sympathischen Ganglion ist Acetylcholin. Die Wirkung des Acetylcholins kann mit Nikotin nachgestellt werden (Feldberg & Gaddum 1934). Die nikotinische Wirkung wird über den nikotinischen Acetylcholinrezeptor (nAChR) vermittelt (Changeux et al. 1970), welcher ein ionotroper Ionenkanal ist, der nach Bindung des Agonisten eine Ionenpore öffnet und einen Kationeneinstrom ermöglicht, hier vor allem Natrium allerdings auch Kalzium. Auf diese Weise wird die schnelle synaptische Übertragung einer Erregung vom präganglionären auf das postganglionäre sympathische Neuron erreicht. Strukturell besteht der transmembranäre nAChR aus fünf verschiedenen Untereinheiten. Diese Untereinheiten weisen eine starke Diversität auf, so gibt es 17 verschiedene Typen ($\alpha 1$ – $\alpha 10$, $\beta 1$ – $\beta 4$, γ , δ und ϵ), die außer $\alpha 8$ – der nur bei Vögeln vorkommt - auch alle beim Menschen nachweisbar sind. Diese Untereinheiten bilden dann hetero- oder homomere Rezeptoren, deren Zusammensetzung den Rezeptorsubtyp bestimmt (Millar & Gotti 2009). Das SCG verfügt über die höchste Dichte an nAChR unter allen vegetativen Ganglien (Mao et al. 2006).

Der vorwiegende Teil der nAChR im SCG ist ein Subtyp aus den Untereinheiten $\alpha 3\beta 4$, gefolgt von dem Heteromer aus $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, zusätzlich lässt sich auch eine kleine Menge eines Heteromers aus $\alpha 3\beta 2\beta 4$ nachweisen (Mao et al. 2006).

Neben der nikotinischen Wirkung von Acetylcholin gibt es auch Wirkungen, die durch Muskarin imitiert werden können (Dale 1914). Die muskarinische Wirkung des Acetylcholins wird über muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) vermittelt. Die Familie der mAChR besteht aus fünf Rezeptoren, die jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden. Alle fünf besitzen sieben transmembranäre Domänen und sind mit einem G-Protein gekoppelt. Die Subtypen M1, M3 und M5 interagieren in erster Linie mit G_q/G_{11} G-Proteinen, während M2 und M4 in erster Linie mit G-Proteinen vom G_i - und G_o -Typ assoziieren (Hulme et al. 2003). Bei dem überwiegenden Teil der mAChR im sympathischen Ganglion handelt es sich um den Subtyp M1 (Marrion et al. 1989). Die Aktivierung der mAChR des SCG hat sowohl einen de- als auch einen hyperpolarisierenden Effekt, wobei die Depolarisation überwiegt (Newberry & Priestley 1987). Diese Aktivierung führt zu einer Signalmodulation der schnellen synaptischen Übertragung (Nishi & Koketsu 1968).

Durch das Zusammenwirken von mAChR und nAChR wird die synaptische Übertragung moduliert, wodurch es bei häufiger Reizung zu einer Desensibilisierung kommt. Eine besondere Rolle spielt dabei der $\alpha 7$ -nAChR, der mit dem mAChR interagiert. Kommt es durch häufige Erregung zu einer Desensitivierung des $\alpha 7$ -nAChR, so führt dies zu einer stärkeren Einflussnahme der mAChR-Aktivierung auf das Membranpotenzial (Yin et al. 2005). Die neuronale Transmission an der Synapse des sympathischen Ganglions wird

jedoch noch durch weitere Faktoren moduliert und so die Aktivität und Erregbarkeit der präganglionären Neurone angepasst, hierbei spielt die Kotransmission durch Neuropeptide eine entscheidende Rolle (Schultzberg et al. 1982). In den paravertebralen Ganglien kommen Enkephalin, Substanz P (SP), Neuropeptid Y, Calcitonin Gene-Related Peptid (CGRP), Bombesin und andere Neuropeptide vor sowie das Gewebshormon Serotonin und Stickstoffmonoxid (NO). Das komplexe Zusammenspiel dieser Stoffe beeinflusst zusätzlich zum cholinergen System die synaptische Transmission (Elfvin et al. 1993; Klimaschewski et al. 1996).

1.3 Die Calcitonin-Peptidfamilie

Die Calcitonin-Peptidfamilie ist eine Gruppe von Peptiden, zu denen Calcitonin, CGRP, Adrenomedullin (AM), Adrenomedullin 2 (AM2) [auch Intermedin (IMD) genannt] und Amylin gehören. Die Peptide dieser Gruppe fallen durch ihre strukturelle Ähnlichkeit auf und interagieren alle mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Abbau der Peptide erfolgt über unspezifische Endopeptidasen (McDowell et al. 1997; Lisy et al. 1998). Neben vielen Gemeinsamkeiten haben sie dennoch deutlich unterschiedliche Funktionen und Verteilungsmuster.

Amylin kommt in sehr hoher Konzentration in den Amyloid-Plaques des Pankreas bei Patienten mit Typ 2-Diabetes vor. Diese wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben (Weichselbaum & Stangl 1901). Die Identifikation von Amylin in diesen Ablagerungen im Rahmen von Diabetes gelang jedoch erst deutlich später zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander (Cooper et al. 1987; Westermark et al. 1987). Amylin ist ein 37 Aminosäuren langes Peptid, welches zunächst als Präpropeptid in den Pankreaszellen gebildet und dann zusammen mit Insulin in sekretorischen Vesikeln gespeichert und freigesetzt wird (Kahn et al. 1990; Pittner et al. 1994). Unter physiologischen Bedingungen spielt Amylin eine Rolle im Glukosestoffwechsel sowie bei der Gewichtsregulation (Isaksson et al. 2005). Es führt aber auch zusammen mit CGRP zu einer verstärkten Insulinresistenz (Molina et al. 1990).

Das ebenfalls 37 Aminosäuren lange **CGRP** wurde 1982 identifiziert (Amara et al. 1982). Man differenziert zwischen α -CGRP und β -CGRP, die sich in drei Aminosäuren voneinander unterscheiden. β -CGRP wird von einem eigenen Gen auf Chromosom 11 kodiert, auf diesem Chromosom liegt auch das Gen für Calcitonin und α -CGRP (Höppener et al. 1984). Während β -CGRP vor allem im enterischen Nervensystem und der Hypophyse vorkommt (Bell & McDermott 1996), ist α -CGRP hingegen vorwiegend im peripheren und zentralen Nervensystem aufzufinden, insbesondere in sensorischen Neuronen der Spinalganglien und der Hirnnervenganglien. Diese Trennung im Expressionsmuster ist allerdings eine deutliche Vereinfachung, da die meisten Neurone in geringen Anteilen beide Formen produzieren. CGRP wird nach seiner Synthese intrazellulär in Sekretionsvesikeln gespeichert und transportiert. Eine Colokalisation von CGRP mit SP wird häufig beschrieben (Gulbenkian et al. 1986). Bei den meisten CGRP enthaltenden Nervenfasern handelt es sich um sensorische Fasern (Yamamoto et al. 1989; Wiesenfeld-Hallin et al. 1984).

Dazu passend wird CGRP in Neuronen des Ganglion trigeminale (Yasuhara et al. 2008) und der Spinalganglien exprimiert. Im Hinterhorn des Rückenmarks verlaufen ebenfalls in

sensorischen Bahnen deren Fasern, die CGRP-Immunreaktivität zeigen (Rosenfeld et al. 1993). Das Vorkommen von CGRP in sensorischen Neuronen spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Sensitivierung von afferenten Neuronen, sondern auch in der Schmerzphysiologie, speziell in der Pathogenese der Migräne, wo es eine schmerzsteigernde Wirkung hat (Uddman et al. 1986). Hier sorgt CGRP nach lokaler Ausschüttung aus afferenten Fasern für eine lokale Sensibilisierung und dadurch zu lokalisierten Kopfschmerzereignissen. Dieser Mechanismus war die Grundlage, CGRP-Antagonisten für die Migränetherapie zu entwickeln. Die hierfür verwendeten Substanzen sind synthetisch hergestellte kompetitive CGRP-Rezeptor-Antagonisten (Ho et al. 2008; Olesen et al. 2004).

Ein eindrücklicher nicht-neuronaler Effekt von CGRP ist die starke vasodilatorische Wirkung. Darüber hinaus ist CGRP an der Entstehung von neurogenen inflammatorischen Prozessen beteiligt. Diese Reaktion entsteht typischerweise nach Hautirritationen und der damit verbundenen CGRP-Freisetzung aus sensiblen Nervenfaserverendigungen (Brain & Williams 1985).

Der Einfluss von CGRP auf die Hämodynamik beschränkt sich jedoch nicht nur auf Vasodilatation, sondern umfasst auch komplexere Mechanismen. So entsteht nach intrazerebroventrikulärer bzw. intravenöser CGRP-Applikation ein kardiovaskulärer Effekt durch einen angehobenen Noradrenalin Spiegel (Fisher et al. 1983). Darüber hinaus kommt es nach intrazerebroventrikulärer CGRP-Applikation auch zu einem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck (Xu & Krukoff 2004).

Ein Vorkommen in Neuronen von sympathischen Ganglien wurde nur für eine kleine Population von Neuronen im Ganglion stellatum von Ratte und Katze gezeigt. Diese sind cholinerg und lassen sich der Schweißdrüseninnervation der Vorderpfote zuordnen (Heym et al. 1993). Weiterhin ließ sich eine CGRP-positive Neuronenpopulation identifizieren, welche nicht der Innervation der Schweißdrüsen dient, deren Funktion jedoch noch unklar ist (Kummer & Heym 1991). Im SCG von Maus und Ratte gibt es bisher keinen Nachweis CGRP-positiver Neurone, jedoch gibt es mehrere Typen von CGRP-positiven Nervenfaserverendigungen im SCG. Im Groben lassen diese sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Solche, die CGRP- und SP- positiv sind und solche, die CGRP- und Tyrosinhydroxylase-positiv sind. Darüber hinaus gibt es zumindest im Ganglion stellatum des Meerschweinchens Beschreibungen über axodendritische Synapsen zwischen CGRP-positiven Nervenfasern mit ganglionären Neuronen (Heym et al. 1993).

Adrenomedullin ist ein 52 Aminosäuren großes Peptid, welches in humanen Phäochromozytomen entdeckt und gleichzeitig in hoher Konzentration aus der Nebenniere isoliert wurde (Kitamura et al. 1993).

Der Genlocus für AM liegt auf Chromosom 11 und besteht aus 4 Exons und 4 Introns (Ishimitsu et al. 1994). Im Adrenomedullingen gibt es Strukturen, die eine mögliche Regulation über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und durch den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) 1 nahelegen (Cormier-Regard et al. 1998; Fink et al. 1988; Garayoa et al. 2000).

Aus der mRNA des AM-Gens wird zunächst das 185 Aminosäuren lange Präproadrenomedullin translatiert. Diese Vorstufe enthält neben einem 21 Aminosäuren langen Signalpeptid Proadrenomedullin, aus dem in einem weiteren Schritt das 52 Aminosäuren lange AM sowie das Proadrenomedullin N-terminale 20 Peptid (PAMP), welches eigene biologische Wirkungen besitzt (Kitamura et al. 1994), gespalten werden. AM trägt eine C-terminale Carbamoyl-Gruppe sowie eine Disulfid-Brücke, welche an der Ausformung einer Ringstruktur beteiligt ist. Diese Modifikationen sind entscheidend für die Funktionalität des Peptids (Eguchi et al. 1994; Kitamura et al. 1994).

Die intrazelluläre Verteilung von AM ist bislang nicht ausreichend geklärt, auch wenn es Hinweise gibt, dass AM als vesikuläres Peptid prozessiert wird (Hobara et al. 2004). AM ist in fast jedem Gewebe nachweisbar und im gesamten zentralen Nervensystem stark exprimiert, wobei eine hohe Konzentration von AM vor allem im Herzen zu finden ist. AM wird von vaskulären glatten Muskelzellen sowie von Endothelzellen sezerniert und erreicht eine hohe Plasma-Konzentration (Ichiki et al. 1994; Sugo et al. 1995; Chun et al. 1997; Isumi et al. 1998).

AM hat bei peripherer Applikation wie CGRP einen stark vasodilatatorischen und somit einen hypotensiven Effekt (Kitamura et al. 1993). Wird AM intrazerebroventrikulär appliziert, führt dies jedoch zu einem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck (Xu & Krukoff 2004).

Die physiologische Rolle von AM scheint vor allen Dingen in der Fähigkeit zu liegen, endotheliale Membranen zu stabilisieren und somit die Flüssigkeitsextravasation zu regulieren. Dies spiegelt sich im Phänotyp einer transgenen Maus wieder, der das AM-Gen fehlt ($AM^{-/-}$). Dieser Genotyp ist bereits im Embryonalstadium E13.5 letal und weist extreme, generalisierte Ödembildung auf, die wahrscheinlich die Ursache für das frühe Versterben darstellt (Caron & Smithies 2001).

Dieser für die endotheliale Integrität essenzielle Mechanismus wird über einen cAMP-abhängigen Effekt bewirkt. Der Anstieg von intrazellulärem cAMP führt zu einer Konformationsänderung des Aktinskeletts und somit zu einer Änderung in der Anordnung der Endothelzellen, was dann wiederum zu einer verringerten Flüssigkeitsextravasation führt (Hippenstiel et al. 2002).

Eine mögliche Anwendung dieser Wirkung zeigt sich im Rahmen des akuten ventilationsbedingten Lungenschadens. Hier resultiert die pharmakologische Gabe von AM

im Mausmodell in einem deutlich protektiven Effekt für das Lungenparenchym (Müller et al. 2010).

Die Erhöhung der AM-Konzentration scheint auch ein körpereigener Mechanismus zu sein, um die Membranintegrität unter Bedingungen pathologischer Extravasation von Flüssigkeit aufrecht zu erhalten. Dies zeigt sich in einem Anstieg der zirkulierenden AM-Konzentration im Rahmen der kongestiven Herzinsuffizienz, einer Erkrankung, bei der es aufgrund einer kardialen Stauung zu starker Ödembildung kommt (Jougasaki et al. 1995). Ein weiteres Beispiel einer körpereigenen Ausschüttung von AM zur Kompensation pathologischer Ödembildung stellt die Korrelation von AM-Plasmalevel von Patienten mit chronischer pulmonaler Hypertension und der Schwere ihrer Erkrankung dar (Kakishita et al. 1999). Beim ischämischen Myokardinfarkt konnte gezeigt werden, dass AM als Adjuvans zusätzlich zur koronaren Intervention einen protektiven Effekt bietet (Kataoka et al. 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Post-Infarktkonzentration von AM im Blutplasma ein Prädiktor für die Überlebensrate von Patienten nach Myokardinfarkt darstellt (Dzielińska et al. 2011). Es zeigt sich, dass vor allem ischämische Zustände mit einer Hochregulation vom AM assoziiert sind.

AM ist unter Hypoxie in der Lage, das hypoxische Absterben von Zellen hinauszuzögern, indem es die Konzentration von Sauerstoff-Radikalen reduziert (Kim et al. 2010). Ein solcher Ischämie-protektiver Effekt zeigt sich zum Beispiel bei einem Mausmodell zur fokalen Hirnischämie, welches die Situation bei einem ischämischen Hirninfarkt nachstellt. Hier konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Plasmakonzentration von AM ansteigt (Wang et al. 1995), sondern auch, dass transgene Mäuse, die neuronspezifisch nicht in der Lage sind, AM zu produzieren, vergrößerte Infarktareale aufweisen (Hurtado et al. 2010). Des Weiteren kommt es zu einer Hochregulation von AM unter Hypoxie in Zellen des Trophoblasten (Marrion et al. 1989) sowie in der Niere (Nagata et al. 1999). Dazu passend ist AM auch an der Vaskulogenese beteiligt und stark mit der Expression des Vascular endothelial growth factor (VEGF) assoziiert. In verschiedenen Tumorarten korreliert die AM-Konzentration mit einer erhöhten Gefäßdichte (Ribatti et al. 2005).

Neuronale, modulatorische Effekte von AM konnten in verschiedenen Modellen gezeigt werden. So kommt es nach intrathekaler Applikation von AM-Antagonisten zu einer Reduktion der Morphintoleranz. Eine direkte neuromodulatorische Wirkung nach Stimulation mit AM zeigt sich vor allem in kardiovaskulären Regulationszentren (Fan et al. 2006), wo es vor allem neuromodulatorische Eigenschaften hat, die zu einer neuronalen Bahnung auf der Ebene von Kalzium-Kanälen führt. Das Vorhandensein solcher Regulationsmechanismen und Signalwege deutet darauf hin, dass AM an der neuronalen Regulation des kardiovaskulären Systems beteiligt ist (Hosokawa et al. 2010).

Ein Vorkommen von AM in sympathischen Ganglien wurde bislang nicht beschrieben, jedoch konnten Vorversuche unserer Arbeitsgruppe eine Expression von AM in SCG und Stellatum der Ratte zeigen (nicht publiziert). Eine genaue Beschreibung der AM-Expression im SCG ist bislang nicht erfolgt.

Adrenomedullin 2 wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen als AM2 (Takei et al. 2004) beziehungsweise als IMD (Roh et al. 2004) entdeckt und beschrieben. Wie sich herausstellte, waren die beschriebenen Peptide jedoch identisch, was in der Literatur im Bezug auf die Nomenklatur bis heute für Unklarheit sorgt. Da der Begriff IMD jedoch auch das Melanozyten stimulierende Hormon bezeichnet, wurde auf dem „7. internationalen Symposium über CGRP, Adrenomedullin, Amylin und Intermedin“ in Bezug auf die Nomenklatur von IMD beschlossen, immer beide Bezeichnungen (AM2/IMD) zu verwenden (August 2010, Queenstown, New Zealand). Dieser Regel folgt die Nomenklatur im folgenden Text.

AM2/IMD wird als 53 Aminosäuren langes Prohormon aus einem Präprohormon abgetrennt (Yang, Qi, et al. 2005). Dieses Prohormon kann dann N-terminal weiter auf 40 oder 47 Aminosäuren verkürzt werden (Roh et al. 2004).

AM2/IMD induziert in Ratte und Maus eine potente und lange anhaltende Blutdrucksenkung mit Herzfrequenzsteigerung nach intravenöser Applikation. Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten Miktion und Verringerung der Magenentleerung sowie der Nahrungsaufnahme. AM2/IMD wird in vielen Organen des Körpers gebildet, so konnte seine Expression im Intermediärlappen der Hypophyse (daher auch Intermedin), im Frontallhirn, in der Lunge, der Nebenniere, der Niere, im Pankreas, dem Magen, Ösophagus, in Dünn- und Dickdarm, in Milz, Thymus und Speicheldrüse nachgewiesen werden (Takei et al. 2004; Roh et al. 2004). Die physiologische Rolle von AM2/IMD ist jedoch immer noch nicht gut verstanden, obwohl viele Wirkungen unter verschiedenen Bedingungen gezeigt werden konnten.

AM2/IMD hat neben seinem hypotensiven Effekt auch einen positiven Einfluss auf die koronare Perfusion (Pan et al. 2005) und erhöht die Kontraktilität von Kardiomyozyten (Dong et al. 2006). Darüber hinaus verringert es den Reperfusionsschaden an isolierten Rattenherzen (Yang, Qi, et al. 2005).

Im zentralen Nervensystem hat AM2/IMD einen Einfluss auf die Ausschüttung der Hypothalamus- und Hypophysenhormone. Es stimuliert die Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon, Prolaktin und Oxytocin, supprimiert jedoch die Sekretion des Wachstumshormons GH (Takahashi et al. 2006). Darüber hinaus scheint es eine wichtige Rolle bei der Prolaktin-Exkretion zu spielen (Chang et al. 2005). Intrazerebroventrikuläre Applikation von AM2/IMD führt im Gegensatz zur peripheren Injektion zu Blutdrucksteigerung und Herzfrequenzsteigerung (Ren et al. 2006).

Unter Hypoxie wird die AM2/IMD-Expression in der Lunge gesteigert, was zu einem Endothel-stabilisierenden Effekt führt (Pfeil et al. 2009). Dieser Effekt wird über einen Anstieg von intrazellulärem cAMP getriggert, der ähnlich wie bei AM die Zell-Zelladhäsion steigert (Aslam et al. 2011).

Im Blutplasma konnte AM2/IMD ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch ist unklar, was die Quelle ist (Bell & McDermott 2008). Die Plasmakonzentrationen von AM2/IMD unterscheiden sich im Vergleich verschiedener Spezies erheblich voneinander. So übertrifft in humanem Plasma, im Gegensatz zum Nager, der Plasmalevel von AM2/IMD (Morimoto et al. 2007), den von AM (Letizia et al. 2002). Obwohl neben der Hypophyse die stärkste AM2/IMD-Expression in der Niere und im Magen zu finden ist (Takahashi et al. 2006), sind die Funktionen des Peptides dort noch nicht geklärt.

1.4 Der Calcitonin-receptor-like-receptor (CLR)

Peptide der Calcitonin-Familie interagieren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die typischerweise sieben transmembranäre Domänen aufweisen (Lin et al. 1991).

Alle Peptide dieser Gruppe können mit einem Rezeptor interagieren – dem CLR, der zu 55% strukturelle Übereinstimmung mit dem Calcitonin-Rezeptor aufweist und nach Stimulation zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP führt. Der CLR gehört zur Klasse B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, ähnlich dem Sekretin-Rezeptor (Njuki et al. 1993; Flühmann et al. 1995).

Beim Menschen ist der CLR in vielen Geweben nachgewiesen worden, so in Sammelrohren der Niere, venösen und arteriellen Gefäßen, dem Endokard, in den Fundusdrüsen des Magens, in endokrinen Zellen von Duodenum und Ileum, im Plexus myentericus, in alveolaren Kapillaren der Lunge, in Makrophagen und Leydig-Zellen im Hoden (Hagner et al. 2002). Der CLR kommt im zentralen Nervensystem der Ratte in sensiblen Arealen, den trigeminalen Hirnnervenkerne und der Medulla oblongata vor. Darüber hinaus zeigte sich ein perivaskuläres Vorkommen in der Dura mater (Lennerz et al. 2008).

Das Fehlen des CLR in transgenen Mäusen (CLR^{-/-}) führt zum Tod der Tiere im Embryonalstadium E12.5 durch eine extreme Ödembildung und kardiovaskuläre Defekte. Der Phänotyp der CLR^{-/-}-Embryonen unterscheidet sich nicht wesentlich von AM^{-/-}-Embryonen, mit der Ausnahme, dass AM^{-/-}-Embryonen erst 24 Stunden später im Embryonalstadium E13.5 versterben (Dackor et al. 2006).

Die Stimulation des CLR mit Calcitonin führt zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, während die Stimulation mit AM oder CGRP keinen Effekt hervorruft (Flühmann et al. 1995). Wird aber zusätzlich zu CLR in der Zellmembran ein „*receptor activity modifying protein*“ (RAMP) exprimiert, kommt es zu einer Rezeptorwirkung für CGRP, AM oder AM2/IMD. Das assoziierte RAMP wirkt als Chaperon und bestimmt so die Affinität des Rezeptors zum Liganden. Im Zusammenhang mit dem CLR sind drei verschiedene RAMPs beschrieben (RAMP1-3). CGRP wirkt ausschließlich dann am CLR, wenn dieser mit RAMP1 assoziiert ist. Eine Bindung mit RAMP2 und 3 ändert die Affinität zu einer stärkeren Bindung von AM (McLatchie et al. 1998). AM2/IMD hat ebenfalls keinen Effekt, wenn es mit CLR allein interagiert, ruft allerdings eine Wirkung in Kombination mit allen drei RAMPs hervor. Die Bindung von AM2/IMD führt allerdings im Gegensatz zur Bindung von AM und CGRP zu einer geringeren Bildung von intrazellulärem cAMP (Roh et al. 2004).

Neben den rezeptor-modulierenden Fähigkeiten spielen die RAMPs auch eine Rolle bei der intrazellulären Verteilung des CLR. Darüber hinaus können sie die Internalisierung des Rezeptors in die Zellmembran bewirken (Kuwasako et al. 2000).

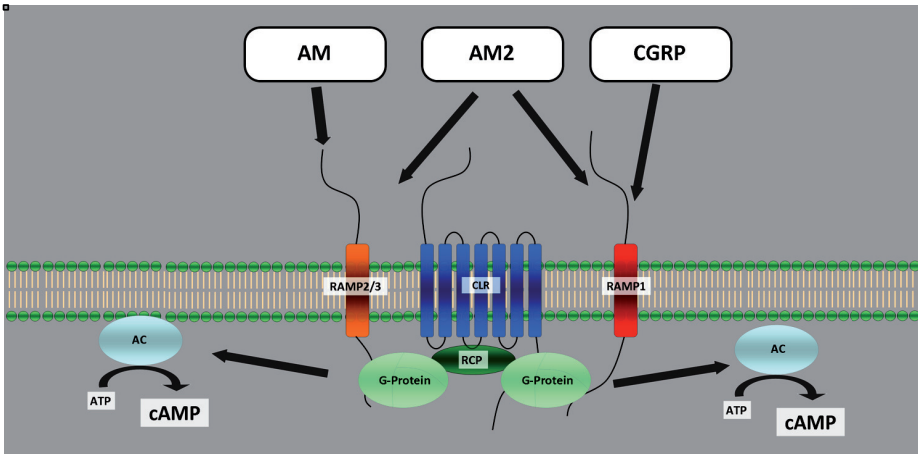


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des CLR und der RAMPs (nach inhaltlichen Angaben in: Evans et al. 2000; McLatchie et al. 1998; Njuki et al. 1993 & Flühmann et al. 1995)

Eine Interaktion der RAMPs wird auch mit anderen Rezeptoren der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren vom Typ B beschrieben. Beispiel hierfür ist die Interaktion der RAMPs mit dem Amylin-Rezeptor (Zumpe et al. 2000).

Der CLR ist jedoch zusätzlich zu den RAMPs noch mit einem weiteren Protein - einem *Receptor-component-protein* (RCP) - assoziiert. Dieses Protein erhöht die cAMP-Bildung, wenn CGRP oder AM an den Rezeptor binden, ohne einen Einfluss auf die Bindungsaffinität zu haben (Evans et al. 2000). Das Zusammenspiel des CLR mit seinen assoziierten Proteinen sowie die Bindung der CGRP-Peptidfamilie sind in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst.

Eine Regulation der Expression des CLR und seiner Komponenten konnte unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedlichen Organsystemen gezeigt werden.

Beispiele hierfür sind die Hochregulation der CLR- und RAMP1-3-Expression bei Leberzirrhose in der Ratte (Hwang et al. 2007) und die Expressionsteigerung von CLR, RAMP1 und 2 bei Nierenschädigung (Mukoyama et al. 2001). In der Lunge kommt es zu einer Expressionsteigerung von RAMP1 und 3 unter hypoxischen Bedingungen (McDowell et al. 1997; Qing et al. 2001; Pfeil et al. 2009). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die mRNA-Expression des CLR unter hypoxischen Bedingungen in humanen Endothelzellen gesteigert ist (Nikitenko et al. 2003).

1.5 Adaptationsmechanismen unter Hypoxie

In der Blutzirkulation von Säugetieren gibt es spezielle Sensororgane, die in der Lage sind, den Sauerstoffpartialdruck des Blutes zu detektieren. Diese sogenannten Paraganglien sind zum Beispiel das Glomus caroticum (De Castro 1927) in der Karotisbifurkation, oder auch die entlang dem Aortenbogen verteilten Aortic Bodies (Coleridge et al. 1970). Der molekulare Mechanismus, der hinter der Erfassung des Blutsauerstoffpartialdrucks steht, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Die führende Theorie ist jedoch, dass der verringerte Sauerstoffpartialdruck dazu führt, dass spezielle Kaliumkanäle in den Zellen der Paraganglien verschlossen werden. Dies führt zu einer Depolarisation der Zelle. Angeregt durch diese Depolarisation kommt es zu einer Freisetzung von Neurotransmittern und Neuropeptiden, die eine neuronale Antwort sensorischer Neurone des Nervus vagus und des Nervus glossopharyngeus provozieren (Zhang et al. 2000; López-Barneo 2003). In Folge dessen kommt es zu einer Aktivierung im Nucleus tractus solitarii (Finley & Katz 1992) und zu einem reflektorischen Anstieg der Atem- und Herzfrequenz. Diese Reflexschleife ist die schnelle neuronale Antwort auf die Hypoxie (Gonzalez et al. 1994). Bei länger anhaltender Sauerstoffunterversorgung kommt es zu dauerhaften Veränderungen, die vor allem durch zelluläre Signalkaskaden getriggert werden. Am Anfang dieser zellulären Adaptation steht HIF. Es gibt drei verschiedene Formen von HIF (1-3), wobei vor allem 1 und 2 für die hypoxische Adaptation verantwortlich sind. HIF besteht aus zwei Untereinheiten, einer α - und einer β -Untereinheit. HIF β wird konstitutiv gebildet und degradiert, dagegen wird HIF α zwar konstitutiv exprimiert, jedoch auch sehr schnell ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Dieser Mechanismus ist sauerstoffabhängig. Fällt der Sauerstoffpartialdruck unter ein kritisches Limit, wird HIF α nicht mehr ubiquitiniert und somit nicht mehr degradiert, so dass es sich mit HIF β zusammenlagern kann. Dieser Komplex wirkt dann als Transkriptionsfaktor für eine Reihe von weiteren Molekülen, die dann langfristige Umbauprozesse wie Gefäßwachstum und Gewebsumbau triggern (Greer et al. 2012). Fällt die Sauerstoffkonzentration unter ein kritisches Level, so kommt es zuerst zur Unterversorgung des zentralen Nervensystems sowie der Nieren. Infolge dieser Hypoxämie kommt es zu irreversiblen Gewebsschädigungen und zum Tod. Die hypoxischen Adaptationsmechanismen sind somit essenziell für ein Individuum, um mit wechselnden Sauerstoffpartialdrücken überleben zu können.

1.6 Ziele der Arbeit

AM wurde erstmals in einem Tumor des Nebennierenmarks entdeckt, welches dem sympathischen Nervensystem zuzuordnen ist. Sowohl AM als auch AM2/IMD und CGRP haben neuromodulatorische Eigenschaften und könnten so auch eine neuromodulatorische Rolle in sympathischen Ganglien haben. Jedoch ist es bislang dennoch nicht ausreichend geklärt, ob es ein neuronales Vorkommen von AM und AM2/IMD in sympathischen paravertebralen Ganglien der Maus gibt und falls ja, welche Funktion die Peptide dort erfüllen könnten, beziehungsweise welchen Regulationsmechanismen sie dort unterliegen.

Ziele dieser Arbeit sind:

- Identifikation der genauen Lokalisation und des Vorkommens von AM, AM2/IMD und CGRP im SCG der Maus
- Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen unter Hypoxie
- Klärung der Wirkung von AM auf sympathische Neurone des murinen SCG

Zusammenfassend ist somit das Ziel ein genaueres Verständnis der Rolle und der Regulation der Peptide der Calcitonin-Peptidfamilie im sympathischen Nervensystem zu gewinnen

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien/Reagenzien

Substanz	Summenformel	Hersteller
2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure)	$C_6H_3N_3O_7$	Merck KGaA, Deutschland
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich, USA
Agarose	$[-C_{12}H_{18}O_9]_n$	Merck KGaA, Deutschland
Aqua dest.	H_2O	Eigenfiltration
Dextransulfat	$(C_6H_9O_5SO_3Na)_{n+1}$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol	C_2H_6O	Sigma-Aldrich, USA
Ethansäure (Eisessig)	$C_2H_4O_2$	Merck KGaA, Deutschland
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd	CH_2O	Merck KGaA, Deutschland
Fura-2	$C_{29}H_{27}N_3O_{14}$	Sigma-Aldrich, USA
Glukose	$C_6H_{12}O_6$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Glycerol	$C_3H_8O_3$	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck KGaA, Deutschland
Kalziumchlorid	$CaCl_2$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Magnesiumchlorid	MgCl	Merck KGaA, Deutschland
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat	$NaHCO_3$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Natriumhydroxid	NaOH	Merck KGaA, Deutschland
Natriumkarbonat	Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Octoxinol 9 (Triton X-100)	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd (PFA)	CH ₂ O	Merck KGaA, Deutschland
Polysorbat 20 (Tween)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Merck KGaA, Deutschland
Polyvinylalkohol (Mowiol®)	[-CH ₂ CHOH-] _n	Merck KGaA, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	C ₆ H ₉ NO	Merck KGaA, Deutschland
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Merck KGaA, Deutschland
Salzsäure (1 M, 2 M, 25% und 37 %)	HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
β-Mercaptoethanol	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich, USA
Stickstoff (flüssig)	N ₂	Linde AG, Deutschland
tri-Natriumcitrat Dihydrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ * 2H ₂ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Triethanolamin (TEA)	C ₆ H ₁₅ NO ₃	Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 1. Chemikalien/Reagenzien

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
24-Well-Platte		Merck KGaA, Deutschland
Deckellose Reaktionsgefäße		Merck KGaA, Deutschland
Einmalhandschuhe	Nobaglov	NOBA Danz GmbH & Co., Deutschland
Fettstift	PAP-Pen	Sigma-Aldrich, USA
Normoxie Gasgemisch		Linde AG, Deutschland
Objekträger (beschichtet)	Super Frost Plus	R. Langenbrink Labor und Medizintechnik, Deutschland
Petrischale		Merck KGaA, Deutschland
Reaktionsgefäße		Merck KGaA, Deutschland
Verschlussfolie	Parafilm®	Pechiney Plastik, USA

Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Calciumimaging Mikroskop	Olympus BX50WI	Olympus, Deutschland
Elektrische Feldstimulation (EFS)	S44-Stimulator	Grass Technologie, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Deutschland
Gelelektrophorese	Peqlab Kammer, Modell 40-1410	Peqlab, Deutschland
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM)	LSM 710	Zeiss, Deutschland
Kryostat	CM 1900	Leica, Deutschland
Kugelmühle	MM300	Retsch GmbH, Deutschland
PCR Cycler	Mastercycler ep gradient	Eppendorf AG, Deutschland
PCR Cycler	Mastercycler personal	Heraeus, Deutschland
Photometer		Leica, Deutschland
Pipetten	Pipetman P	Gilson, USA
Real Time PCR Cycler	MyiQ 2	Biorad, USA
Rollenpumpe	Gilson minipuls 2	Gilson, USA
UV-Kamera	IMAGO	TiLL Photonics, Deutschland
Wasserfiltrieranlage	Millipore Q	Merck KGaA, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge	Eppendorf AG, Deutschland

Tabelle 3. Geräte

2.1.4 Gebrauchslösungen allgemein

Name	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer	115 ml Lösung A; 385 ml Lösung B; mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
18% Saccharose	18 g Saccharose in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer
4% PFA	40 g PFA; 400 ml Aqua dest. mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 1000 ml auffüllen
Gepuffertes Glycerol	15,9 g Na ₂ CO ₃ ; 25,2 g NaHCO ₃ ; 300 ml Aqua dest.; 300 ml Glycerol
HEPES-Puffer	0,836 g KCl; 15,94 g NaCl; 2 ml 1 M MgCl in H ₂ O; 2,2 M CaCl ₂ in H ₂ O; 3,96 g Glucose; 4,76 g HEPES. Auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
Histoblocklösung	10% Pferdeserum; 0,5% Tween; 0,1% BSA; 89,4% PBS
Krebs-Henseleit-Puffer	107 g NaCl; 4,5 g KCl; 25 g NaHCO ₃ ; 1,8 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 NaH ₂ PO ₄ ; 1,25 CaCl ₂ ; 1 MgSO ₄ ; 12,2 Glukose
Lösung A	31,2 g NaH ₂ PO ₄ ; 1l Aqua dest.
Lösung B	35,6 g Na ₂ HPO ₄ ; 1l Aqua dest.
Mowiol	6 g Glycerol; 2,4 g Mowiol; 6 ml Aqua dest.; 12 ml TAE
PBS	28,7 ml Lösung A; 96,2 ml Lösung B; 22,4 g NaCl; mit Aqua dest. auf 5000 ml auffüllen
PBS+S	28,7 ml Lösung A; 96,2 ml Lösung B; 44,8 g NaCl; mit Aqua dest. auf 5000 ml auffüllen
TAE-Puffer	242 g TRIS; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA; auffüllen mit Aqua dest.
0,3% Tritonlösung	3 g Triton X; 1000 ml PBS
Vorspüllösung	25 g/l PVP; 9 g/l NaCl; 5 g/l Procain; 2 ml/l Heparin
Zamboni Fixans	50 ml 37 % Formaldehyd; 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer; 150 ml Pikrinsäure; mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Tabelle 4. Gebrauchslösungen

2.1.5 Materialien für PCR, RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Reagenz	Hersteller
100 Basenpaarmarker	Invitrogen, Deutschland
10fach PCR Puffer	Invitrogen, Deutschland
Aqua dest.	Fresenius, Deutschland
Dnase	Invitrogen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, USA
EDTA	Invitrogen, Deutschland
Oligonucleotide (dATP, dGTP, dGCP, dTTP)	Invitrogen, Deutschland
Orange G Ladepuffer	Sigma-Aldrich, USA
Primer	Eurofins, Deutschland
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Deutschland
Rnase	Invitrogen, Deutschland
SYBR Green Mastermix	Biorad, USA
TRIzol	Invitrogen, Deutschland

Tabelle 5. PCR-Materialien

2.1.6 Primärantikörper

Antigen	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung
AM	Human, polyklonal	Serotec, Deutschland	1/800
AM2/IMD	Human, polyklonal	Serotec, Deutschland	1/3200
CGRP	Kaninchen, polyklonal	Penninsula, USA	1/24000
CGRP	Ziege, polyklonal	Biotrend, Deutschland	1/4000
CLR	Kaninchen, polyklonal	Dr. G. McGregor, Physiologisches Institut Universität Marburg	1/1600
RAMP 1	Kaninchen, polyklonal	Proteintech, Deutschland	1/50
RAMP 2	Kaninchen, polyklonal	Proteintech, Deutschland	1/200
RAMP 3	Kaninchen, polyklonal	Proteintech, Deutschland	1/80
SP	Ratte, monoklonal	Boehringer Ingelheim, Deutschland	1/400
VACHT	Ziege, polyklonal	Santa Cruz, USA	1/500

Tabelle 6. Primärantikörper

2.1.7 Sekundärantikörper/-reagenzien

Antigen	Wirt	Verdünnung	Konjugat	Bezugsquelle
Human-Ig	Ziege	1/500	Cy3	Dianova GmbH, Deutschland
Kaninchen-Ig	Esel	1/1000	Cy3	Amersham, England
Kaninchen-Ig	Esel	1/1500	Cy-5	Dianova GmbH, Deutschland
Ratte-Ig	Schaf	1/100	Biotin	Amersham, England
Ratte-Ig	Esel	1/400	FITC	Dianova GmbH, Deutschland
Tertiärreagenz (Streptavidin)		1/1000	FITC	Sigma-Aldrich, USA
Ziege-Ig	Esel	1:800	Cy3	Chemicon International, USA
Ziege-Ig	Esel	1/2000	FITC	Amersham, England

Tabelle 7. Sekundärantikörper/-reagenzien; Ig = Immunglobulin

2.1.8 Software

Programm	Hersteller	Verwendung
TiLLVision	TiLL Photonics, Deutschland	Kalzium-Imaging Software
Axiovision	Siemens, Deutschland	Datenerfassung Fluoreszenzmikroskopie
Excel	Microsoft, USA	Grafiken, Datenverarbeitung
Imaris	Bitplane, USA	3D-Rekonstruktion von CLSM-Bildern
Power-Point	Microsoft, USA	Bildbearbeitung
R-Statistics	The R Project, Freeware	Graphiken
SPSS	IBM, Deutschland	Statistik

Tabelle 8. Software

2.1.9 Zellkulturmaterialien

Artikel	Hersteller
Coverslips	Thermo Fisher Scientific Inc. , USA
Liberase	Sigma-Aldrich, USA
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco/Invitrogen, Deutschland
Normoxie Gasgemisch	Linde AG, Deutschland
Polylysin	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 9. Zellkulturmaterialien

2.1.10 Pharmaka

Substanz	Hersteller
AM	Sigma-Aldrich, USA
AM2/IMD	Sigma-Aldrich, USA
Atropin	Sigma-Aldrich, USA
CGRP	Sigma-Aldrich, USA
CGRP 8-37	Sigma-Aldrich, USA
Heparin	Fresenius GmbH, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH
Mecamylamin	Sigma-Aldrich, USA
Muskarin	Sigma-Aldrich, USA
Nikotin	Sigma-Aldrich, USA
Procain	Steigerwald Arzneimittel, Deutschland

Tabelle 10. Pharmaka

2.1.11 Sonstige Lösungen

Lösung	Verwendung	Bezugsquelle
BSA	Blocklösung	Sigma-Aldrich, USA
DAPI	Zellkernfärbung	Sigma-Aldrich, USA
Pferdeserum	Blocklösung	Schlachthof Marburg, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Einbettmedium	Sakura Europe, Niederlande

Tabelle 11. Sonstige Lösungen

2.2 Mäusstämme

Für die Haltung und Tötung zur Organentnahme der verschiedenen Mäusstämme lagen Genehmigungen des Regierungspräsidiums Gießen vor, die jeweiligen Aktenzeichen (AZ) sind in Klammern bei den verschiedenen Mäusstämmen aufgeführt. Als Wildtypstamm wurden C57Bl/6N-Mäuse (Bl6) von Charles River (Sulzfeld) verwendet (AZ: GI 20/23-Nr.A41/2011). Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtstamm, bei dem die Firma die genetische Identität garantiert. Alle Mäuse sind genomisch - vergleichbar mit einigen Zwillingen - miteinander übereinstimmend.

Bei der von uns verwendeten transgenic a3b4a5 cluster-Maus (tabac-Maus) (Frahm et al. 2011) handelt es sich um einen transgenen Stamm, der unter dem Promoter der alpha 3-Untereinheit des nikotinischen nAChR das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (Shimomura et al. 1962) exprimiert. Darüber hinaus besteht bei diesen Tieren eine Überexpression der $\beta 4$ -Untereinheit des nAChR (Frahm et al. 2011). Die $M1^{-/-}$ -Maus ist durch das Fehlen des Gens für den mAChR Typ1 gekennzeichnet (Fisahn et al. 2002). Dieser Typ von mAChR ist der überwiegende Subtyp an der Synapse sympathischer Ganglien (Marrion et al. 1989) (AZ: GI 20/23-Nr.A9/2011).

Es wurde ein Mäusstamm eingesetzt, der unter dem Promoter der Cholinacetyltransferase (ChAT) enhanced green fluorescent protein (eGFP) produziert (Tallini et al. 2006), das somit mit dem entsprechenden Filter im Fluoreszenzmikroskop in allen cholinergen Zellen detektierbar ist (AZ: GI 20/23-Nr.A11/2011).

Zur Antikörperaustestung verwendeten wir einen konditionalen AM-Knockoutstamm (kond. $AM^{-/-}$). Bei diesen Mäusen wird in allen Neuronen des zentralen Nervensystems das AM-Gen nicht exprimiert (Fernández et al. 2008). Darüber hinaus verwendeten wir Embryonen eines RAMP2-Knockoutstammes ($RAMP2^{-/-}$) (Ichikawa-Shindo et al. 2008). Diese beiden Mäusstämme wurden nicht in Gießen gehalten und die zur Untersuchung herangezogenen Gewebeproben direkt von den Kooperationspartnern bezogen.

2.3 Methoden

2.3.1 Organgewinnung zur Immunhistochemie

10 Wochen alte männliche Bl6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden durch Inhalation von Isofluran getötet. Anschließend wurde eine Kanüle in den linken Herzventrikel eingeführt, das rechte Herzohr eröffnet, das Blut mit ca. 300 ml Vorspüllösung ausgewaschen und durch Infusion von ca. 200 ml 4% PFA das Gewebe perfusionsfixiert. Die Ganglien wurden herauspräpariert und mit zehnfachem Volumen 0,1 M Phosphatpuffer bei mehrfachem Wechsel gewaschen.

Nach circa zwölfstündigem Waschen wurden die Gewebeproben über Nacht in 18%ige Saccharose-Lösung eingelegt und anschließend mit flüssigem Stickstoff in O.C.T-Compound eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung lagerte das Gewebe bei -20°C. Die Tötung der Tiere, welche bei unseren Kooperationspartnern gehalten wurden, erfolgte analog. Die Proben wurden uns in PFA zugesandt.

2.3.2 Organgewinnung für PCR-Untersuchungen

Auch hier wurden die Mäuse durch Inhalation von Isofluran getötet, anschließend wurden sie durch Eröffnung der Vena cava inferior und der abdominalen Aorta ausgeblutet.

Nun wurden die verschiedenen Organe entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.3.3 Immunhistochemie

Die in O.C.T. Compound eingebetteten Organe wurden bei -23°C mit Hilfe eines Kryostaten in 4-14 µm dicke Schnitte geschnitten und mit einem Objektträger aufgenommen. Die Gewebeschnitte wurden auf dem Objektträger mit einem Fettstift umkreist und für 30 min an der Luft getrocknet. Pro Objektträger wurden 100 µl Blocklösung aufgetragen. Die Blocklösung wurde eine Stunde lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Absaugen der Blocklösung wurden 100 µl Primärantikörper-PBS+S Gemisch nach erforderlicher Konzentration (s. Tabelle 6) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Austrocknen zu verhindern, wurde die Kammer mit Verschlussfolie abgedichtet.

Danach wurde das Primärantikörper-PBS+S-Gemisch von den Objektträgern abgesaugt und diese dreimal für 10 min in einer 60 ml Glasküvette in PBS gewaschen. Überschüssiges PBS wurde abgesaugt und der Sekundärantikörper, verdünnt mit PBS+S, in der erforderlichen

Konzentration (siehe Tabelle 7) zu 100 µl pro Objektträger aufgetragen und dieser für eine Stunde in der feuchten Kammer gelagert.

Da nicht für alle Spezies-Kombinationen passende, mit Fluorophor konjugierte Sekundärantikörper vorhanden waren, wurde das Verfahren zum Teil durch den Einsatz einer Biotin-Streptavidinbrücke modifiziert. Hierbei wurde zunächst, wie bereits zuvor erläutert, der Primärantikörper ausgewaschen, nun aber zunächst 100 µl eines immunglobulinspezifischen, mit Biotin-gekoppelten Antikörpers für eine Stunde hinzugegeben. Nachdem dieser dreimal 10 min in 60 ml PBS in einer Glasküvette ausgewaschen wurde, konnte nun mit Fluorophor gekoppelte Streptavidin hinzugegeben werden, welches an das Biotin band und so eine Markierung hervorrief. Bei Markierungen von mehr als zwei Antigenen wurde nach der Inkubation mit den Primärantikörpern und den darauffolgenden Waschschritten für eine Stunde mit einem Biotin-gekoppelten Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde wieder dreimalig für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend die zwei Sekundärantikörper zusammen mit dem Fluorophor gekoppelte Streptavidin hinzugegeben. Zur Darstellung der Zellkerne wurde teilweise noch eine Markierung mittels DAPI (1/100 in PBS) angeschlossen. Hierbei erfolgte nach dreimaligem, 10 min langem Waschen in PBS eine weitere Inkubation für eine Stunde mit dem DAPI-Farbstoff. Bei allen Varianten war das weitere Vorgehen gleich, wieder wurden die Objektträger in einer Glasküvette in PBS gewaschen und anschließend zur Fixierung der Schnitte in eine gleichartige Küvette für 10 min in 4% PFA gestellt. Das Fixiermittel wurde wieder mit PBS in Glasküvetten dreimal 10 min lang ausgewaschen. Eine dreifach-Markierung wurde mit Antikörpern gegen CGRP, SP und VAcHt durchgeführt (vgl. Abb.16), eine genaue Auflistung der Primärantikörper und den entsprechenden Sekundärantikörpern bzw. -reagenzien ist in Tabelle 12. dargestellt.

Nun wurden die Objektträger mit Hilfe eines Saugers von Flüssigkeit befreit, mit 40 µl gepuffertem Glycerol überzogen und mit einem Deckglas (20x20) bedeckt.

Die Gewebeschnitte konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop oder dem CLSM betrachtet werden, hierzu wurden jeweils der dem Konjugat entsprechende Filter oder Wellenlängen gewählt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei 4°C.

Die weitere Verarbeitung der Bilder des CLSM erfolgte mittels der Imaris Software, die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mittels Kamera aufgezeichnet und mit der Axioplan Software bearbeitet. Die weitere Bildbearbeitung beschränkte sich auf generelle Anpassungen der Bildhelligkeit und des Kontrastes.

Primärantikörper	Biotin-gekoppelter Antikörper	Sekundärantikörper/-reagenz
CGRP (Kaninchen polyklonal , Penninsula USA, 1/24000)		Kaninchen-Ig Cy5 (Esel, Dianova GmbH, Deutschland 1/1500)
SP (Ratte monoklonal, Boehringer Ingelheim, Deutschlan, 1/400)	Ratte-Ig (Schaf, Amersham, England, 1/100)	Streptavidin FITC (Sigma-Aldrich, USA, 1/1000)
VACHT (Ziege, polyklonal, Santa Cruz, USA, 1/500)		Ziege-Ig Cy3 (Esel, Chemicon International, USA, 1/800)

Tabelle 12. Antikörperkombinationen bei der Dreifachmarkierung

2.3.4 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen RNA-Isolationskits gewonnen, in dem die folgenden Lösungen enthalten sind: RW1-Waschpuffer und RPE-Waschpuffer, sowie ein Lysispuffer (RLT-Puffer,) zu welchem vor Verwendung noch β -Mercaptoethanol nach Herstellerangaben (10 μ l/ml) hinzugegeben wurde.

Hierfür wurde das entnommene Gewebe zunächst mit 350 μ l Lysis-Puffer versetzt und in einer Kugelmühle 5 min homogenisiert. Danach wurden die Proben 5 min bei 16.085 x g herunterzentrifugiert, der Überstand abpipettiert, zu gleichen Teilen mit 70% Ethanol verdünnt, nach Durchmischung auf eine Waschsäule aufgetragen und 2 min bei 16.085 x g zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und 700 μ l des in dem Isolationsset enthaltenen RW1-Waschpuffers aufgetragen und 1 min bei 16.085 x g zentrifugiert. Auch hier wurde der abzentrifugierte Anteil verworfen. Nun wurden in einem letzten Waschschriff 700 μ l des RPE1-Waschpuffers aus dem Set hinzugegeben und für 2 min herunterzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sieb der Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30 μ l Wasser auf die Säule aufgetragen und für 2 min zentrifugiert.

Das so gewonnene Eluat wurde mit Hilfe eines Photometers auf RNA-Gehalt hin überprüft. Einen Sonderfall stellte wegen des hohen Fettgehalts die RNA-Isolation von Bestandteilen des zentralen Nervensystems dar, hierfür wurde TRIzol nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll angewendet.

Im zweiten Schritt wurde die cDNA synthetisiert. Hierfür wurde zunächst die genomische DNA durch Zugabe von DNase bei 15 min unter 25°C verdaut. Von diesem Enzym wurden 1 μ l pro Probe zugefügt, für jede Probe wurden 1-8 μ l Eluat eingesetzt – abhängig vom RNA-Gehalt maximal 8 μ l oder 1 μ g - und mit Wasser und 1 μ l eines 10x Puffers auf insgesamt 10 μ l aufgefüllt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l EDTA und Inkubation für 10 min bei 65°C unterbrochen. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min auf 4°C heruntergekühlt. Nun wurde die Mischung für die cDNA-Synthese zugegeben, diese bestand aus 2 μ l Dithiothreitol, 4 μ l 10xPuffer, je 1 μ l Oligodinukleotidsequenzen und Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) und 1 μ l Reverse Transkriptase (RT). Bei jedem Umschreiben wurde eine Extraprobe als Minus-RT-Kontrolle mitlaufen gelassen, bei dieser Probe wurde die RT durch 1 μ l H₂O ersetzt. Die Umschreibung der cDNA erfolgte dann für 50 min bei 42°C und wurde durch eine einminütige Phase bei 72°C abgebrochen und die Temperatur bei 4°C gehalten.

2.3.5 Real-Time RT-PCR

Zunächst wurde für jeden Primer eine Grundmischung erstellt, die für jede Probe 12,5 µl des SYBR Green Mastermix und 9,75 µl Wasser enthielt und mit 0,75 µl einer Lösung von Forward- und Reverseprimer 1/10 in Wasser versetzt wurde.

Danach wurden 23 µl der Grundmischung in deckellose Reaktionsgefäße aliquotiert und 2 µl 1:2 verdünnter cDNA des jeweiligen Gewebes hinzugefügt, diese cDNA wurde wie zuvor beschrieben synthetisiert.

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines „Real-Time Cyclers“. Nach 5-minütiger Aktivierungsphase bei 95°C folgten je 20 s 95°C, 42°C und 75°C. Im Anschluss an 40 Zyklen dieser drei Intervalle wurde eine Schmelzkurve erstellt (siehe Abbildung 2), welche mit einem für das Zielgen typischen Verlauf einen Hinweis auf eine spezifische Reaktion ergibt. Am Ende des Programms wurde die Temperatur bei 20°C gehalten. Jede Probe wurde doppelt bestimmt und der Mittelwert gebildet.

Zur Trennung der einzelnen Banden und zur Auswertung wurden die Proben auf ein Agarosegel (2% Agarose in TAE Puffer) aufgetragen, welches zuvor mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt wurde, um die Fragmente später unter UV-Licht sichtbar zu machen. Im Anschluss wurden die Proben mit 6 µl „Orange-G“-Ladepuffer versetzt auf das Gel aufgetragen und in einer Gelelektrophoresekammer bei 100 V für 40 min aufgetrennt. Die Analyse wurde unter einer UV-Kamera in Referenz zu einem 100-Basenpaarmarker durchgeführt. Als Kontrolle für eine Verunreinigung der Proben mit DNA wurden PCR-Reaktionen mit Wasser anstatt Zugabe von cDNA durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Kontrollreaktionen ohne RT durchgeführt, um den Verdau der genomischen DNA im Rahmen der cDNA-Synthese zu kontrollieren.

Zielgen	Sequenz	Produktlänge	Genbank Nr.
β2-Mikroglobulin (MG)	Forward: ATGGGAAGCCGAACATACCTG Reverse: CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT	176 bp	NM009735 178
AM2/IMD	Forward: GGTAACCCTCGGTTGCATCA Reverse: GGCATGACGACGAGACTTCC	178 bp	NM182828
AM	Forward: GAAGCCCACATTCGTGTCA Reverse: TGCCGTCCTTGCTTTGTC	140 bp	NM009627
CGRP	Forward: CTCCCCTTTCCTGGTTGTC Reverse: TCAGCCTCCTGCTCTTCCT	201 bp	NM_007587
CLR	Forward: GCAGGACCCCATCAACA Reverse: GGATGCCGAAACCAGTGT	185 bp	NM_018782
Endothelin 1	Forward: CTGGTGGAAGGAAGGAACT Reverse: AGTCAATGTGCTCGGTTGTG	131 bp	NM_010104
RAMP1	Forward: ATGGTGTGACTGGGGAAAGA Reverse: CAATGAAAGGGCAGAGGATG	205 bp	NM_016894
RAMP2	Forward: TCCCTGAACCAATCTCTTCC Reverse: GTCGCTGTAATGCCTGCTAA	185 bp	NM_019444

RAMP3	Forward:		
	GCAACGAGACAGGGATGC		
	Reverse:	312 bp	NM_019511
	GCCACAGTCAGCACGACA		
Tropomyosin- Rezeptorkinase B (TrkB)	Forward:		
	ACATTTCCGCCACCTTGA		
	Reverse:	243 bp	NM_001025074
	CACAGACTTTCCTTCCTCCA		

Tabelle 13. Primer

2.3.6 Berechnung der relativen Expression

Bei der Quantifizierung wird die Expression des untersuchten Gens (Target Gen) im Vergleich zur Expression eines bekannten Gens (Housekeeping Gen) in der selben Probe errechnet.

Als Housekeeping Gen wurde hier β_2 -Mikroglobulin (MG) verwendet. Für jede mRNA wurde aus der Doppelbestimmung in jeder Probe der Mittelwert des Cycle Threshold (CT) gebildet. Die Differenz zwischen dem CT-Wert des untersuchenden Gens und dem MG CT-Wert wurde gebildet (siehe Abbildung 2). Daraus resultiert der Delta CT-Wert.

Dann wurde die relative Expression als die 2. Potenz des Delta CT-Wert berechnet. Dieser Wert wird im Weiteren als relative Expression zu MG verwendet. Im Weiteren wurde der Durchschnitt der relativen Expressionen der Kontrollgruppe gebildet und durch diesen die relative Expression des Target Gens in der Experimentgruppe geteilt, daraus resultiert dann eine willkürliche Festlegung der Kontrollgruppe auf eins und die Expression der Experimentgruppe als vielfaches dieser. Dieser Wert wird im Weiteren als relative Expression zur Kontrollgruppe bezeichnet

$$\rightarrow \Delta CT = CT \text{ Target Gen} - CT \text{ Housekeeping Gen}$$

$$\rightarrow v \text{ rel. Expression} = 2^{-\Delta CT}$$

$$\rightarrow \text{rel. Expression Kontrollgruppe} = 1$$

$$\text{rel. Expression Experimentgruppe} = x$$

$$\Rightarrow \text{relative Expression} = \frac{v \text{ rel. Expression Kontrollgruppe}}{v \text{ rel. Expression Experimentgruppe}}$$

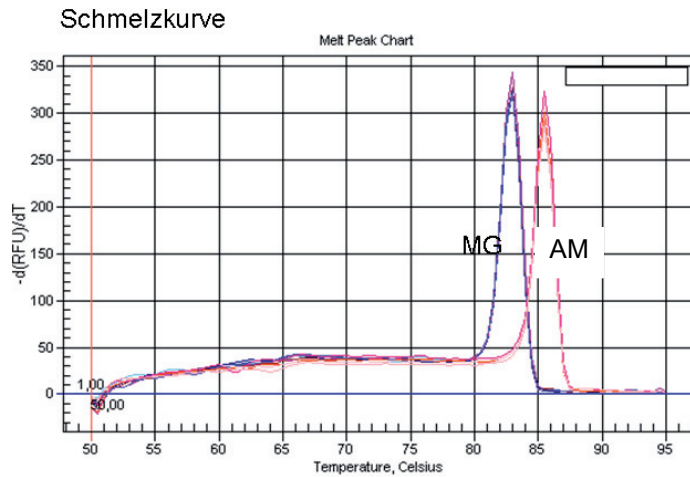
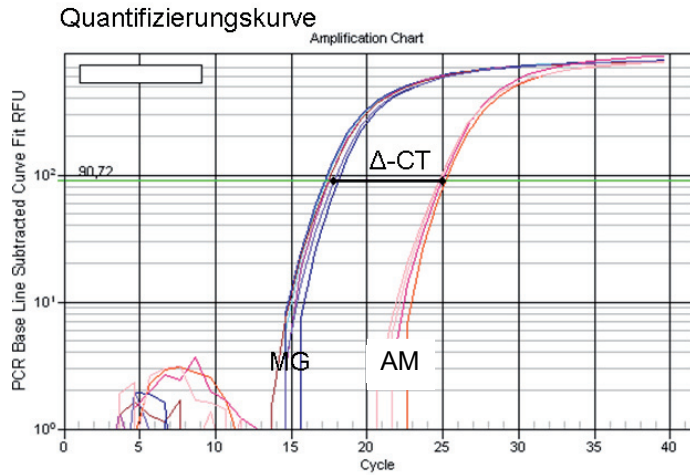


Abbildung 2. Beispiel für Rohdaten der quantitativen PCR und von Schmelzkurven

2.3.7 Nervenquetschungsversuche

Die Mäuse wurden auch bei diesem Verfahren durch Inhalation von Isofluran getötet und durch Eröffnung der Vena cava inferior und der abdominalen Aorta ausgeblutet. Anschließend wurde der Halsgrenzstrang mit dem SCG herauspräpariert und auf ein Wachsplättchen mit Minutiennadeln aufgespießt. Dort wurde der Nerv mit der Pinzette gequetscht und anschließend in HEPES-Puffer überführt, wo die Proben über Nacht bei 37°C mit Umgebungsluft begast wurden. Im Anschluss wurden die Proben als Wholemout für die Mikroskopie weiterverarbeitet.

2.3.8 Herstellung von Wholemoutpräparaten

Bei diesem Verfahren wurde der sympathische Halsgrenzstrang zunächst nach dem Nervenquetschungsversuch 15 min in PBS gewaschen, anschließend zur Permeabilisierung 2 h in 0,3% Tritonlösung eingelegt. Im Anschluss daran wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch Zugabe einer Blocklösung (1% BSA, 4% Pferdeserum in PBS) für zwei Stunden abgeblockt.

Die Inkubation des Primäntikörpers erfolgte in derselben Konzentration (Tab. 8) wie bei der Immunfluoreszenz ebenfalls über Nacht. Danach folgte fünfmaliges Waschen in PBS für jeweils 60 min, dann erneutes Blocken mit derselben Blocklösung (1% BSA, 4% Pferdeserum in PBS).

Im Anschluss wurde der entsprechende Sekundäntikörper (Tab. 9) über Nacht hinzugegeben. Zum Abschluss wurde gewaschen und anschließend mit Mowiol eingedeckelt. Die Präparate wurden dann mit Hilfe des CLSM analysiert.

2.3.9 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in isolierten SCG-Zellen

Für die Versuche wurden tabac-Mäuse verwendet. Zunächst wurden nach Tötung der Mäuse die SCG entnommen und in gekühltes MEM-Medium überführt. Um genügend Zellen für die folgenden Versuche zu erhalten, wurden die SCG von vier Mäusen gepoolt. Im Anschluss an die Präparation wurden die Ganglien in MEM-Medium überführt. Im Folgenden wurde das MEM-Medium durch Liberase ersetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch mit der Liberase abpipettiert und die Zellen mit MEM-Medium gewaschen. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C mit Trypsin sowie ein anschließender Waschschritt mit MEM-Medium. Nach diesem enzymatischen Verdau erfolgte die mechanische Dissoziation mittels Glas-Pasteurpipette. Im Anschluss daran wurde das Zellisolat nun auf Deckgläschen gegeben, welche zuvor mit Polylysin beschichtet wurden. Hierfür werden ca 50 µl Polylysin (0,1 mg/ml gelöst in Aqua dest.) auf die

Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 37°C getrocknet. Diese Deckgläschen wurden nun bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach 2 Stunden wurden die Deckgläschen mit MEM-Medium gewaschen und mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 für 30 Minuten beladen.

Bei der anschließenden Messung wurde Fura-2 durch Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von >420 nm aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit dem Olympus BX50WI Lichtmikroskop und einem 20er Wasserimmersionsobjektiv. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 340 und 380 nm (Ratio) korreliert hierbei direkt proportional mit der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Während der Messung erfolgte mit Hilfe einer Pumpe eine kontinuierliche Spülung der Zellen mit MEM-Medium, die Temperatur wurde bei 37°C konstant gehalten.

Es wurden zunächst vor Beginn der Messung Zellen markiert, die sowohl mit Fura-2 beladen als auch eGFP-positiv waren. Nun wurde während des Versuches alle 10 Sekunden eine Messung durchgeführt.

Bei dem verwendeten Stimulationsprotokoll wurde zunächst AM (10^{-8} M) oder als Kontrolle Medium zu den Zellen hinzugegeben, nach vier Minuten wurde mit Nikotin (10^{-4} M) stimuliert, abschließend erfolgte eine Kontrolle mit KCl (10^{-3} M). Zellen, die hierbei keinen Anstieg der Fluoreszenz um mindestens 30% zeigten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Im Anschluss an die Experimente wurden die Daten manuell mit Hilfe der „TiLLVision“ Software ausgewertet.

2.3.10 Hypoxieversuche

Die Tierversuche, aus denen das in dieser Versuchsserie verwendete Gewebe stammt, wurden durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (VI63-19c20-15(1)GI20/10 Nr.49/2003) und folgten den ethischen und rechtlichen Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden dankenswerter Weise in der Tierversuchseinrichtung von Prof. Dr. Norbert Weissmann im 'Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System' in Gießen durchgeführt und die Proben uns zur Verfügung gestellt.

10 Wochen alte männliche Bl6-Mäuse wurden in Gruppen von maximal vier Tieren für einen Tag in eine Kammer mit 10% O₂ in der Atemluft verbracht (normobare Hypoxie). Hier wurde über die gesamte Zeit der Sauerstoffgehalt gemessen und dokumentiert. Es kam zu keiner Zeit zu einer relevanten Abweichung des Sauerstoffgehalts. Als Kontrolle wurden identisch behandelte Tiere desselben Stamms für einen Tag in eine identische Kammer mit einem Sauerstoffgehalt von 21% O₂ verbracht. Diese Methode ist etabliert und in der Literatur

beschrieben (Weissmann et al. 2005). Nach dem eintägigen Aufenthalt wurden die Mäuse wie oben beschrieben getötet und ihre Organe, wie oben beschrieben, weiter aufgearbeitet.

2.3.11 Isolierung und Inkubation von entnommenen Ganglien

Zunächst wurde MEM-Medium mit Normoxie-Gasgemisch (21% O₂, 5% CO₂ und 74% N₂) bei 37°C vorbegast, danach wurde eine 24-Well-Platte mit je 500 µl Medium pro Probe befüllt. Dann wurden die SCG herauspräpariert und in eine Petrischale mit Medium überführt, bis die Präparation abgeschlossen war. Im Anschluss wurden in den verschiedenen Versuchen jeweils Nikotin (10⁻⁴ M), Muskarin (10⁻⁴ M), CGRP (10⁻⁷ M), Mecamylamin (10⁻⁴ M), Atropin (10⁻⁴ M) und CGRP 8-37 (10⁻⁴ M) hinzugefügt und die Platte in einer Kammer unter Normoxiebegasung für 6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Ganglien in ein Medium ohne Pharmakon-Zusatz überführt, um die Pharmaka auszuwaschen, und im Anschluss in den bereits in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Lysis-Puffer in flüssigem N₂ eingefroren und für die quantitative PCR verarbeitet.

2.3.12 Elektrische Feldstimulation (EFS)

Zunächst wurden 10 Wochen alte männliche Bl6-Mäuse wie bereits bei den vorherbeschriebenen Versuchen mit tiefer Narkose durch Isofluran und anschließender Eröffnung des Herzens durch Ausbluten getötet. Anschließend wurden die SCG herauspräpariert und mit Hilfe von Minutiennadeln auf ein kleines Stück eines Silikonschlauches aufgespießt. Diese wurden dann in einen Glaskolben mit carbogenbegastem (5 % CO₂ und 95 % O₂) Krebs-Henseleit-Puffer (ph 7,4) schwimmen gelassen. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Wasserbades konstant bei 37°C gehalten. Es erfolgte die Feldstimulation mit 10 V, 10 Hz über 3 Stunden. Danach wurden die Ganglien in Lysis-Puffer für die weitere PCR-Analyse überführt und weiterverarbeitet.

2.3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistik-Software SPSS vorgenommen. Hierfür wurden Gruppen mit Hilfe eines Mann-Whitney-Tests verglichen.

Ein p-Wert von ≤ 0,05 wurde als signifikant und ein Wert ≤ 0,01 als hochsignifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Spezifitätskontrolle verwendeter Antikörper

Zur Kontrolle der verschiedenen verwendeten Antikörper wurden verschiedene Methoden gewählt. Für den Antikörper gegen CGRP wurde keine Kontrolle angefertigt, da die Spezifität des Antikörpers bereits vielfach von unserer Arbeitsgruppe in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde (Krasteva et al. 2011).

Für die Spezifitätskontrolle des monoklonalen Antikörpers gegen AM wurde eine Austestung am Kleinhirn von kond. $AM^{-/-}$ -Mäusen durchgeführt (Abb. 3).

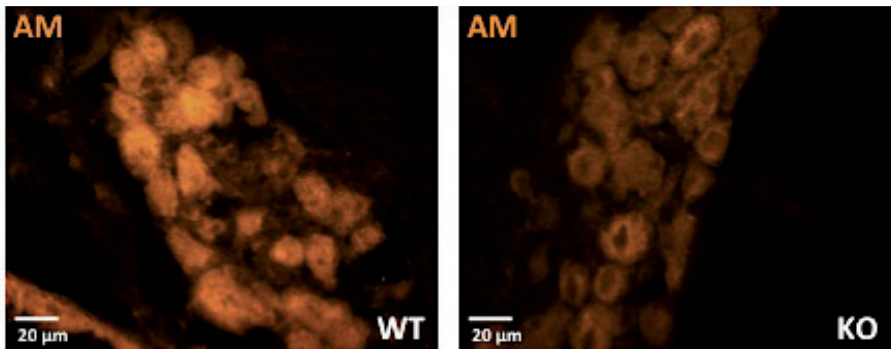


Abbildung 3. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen AM; Neuronengruppen in Kleinhirnkernen einer Bl6-Maus (WT) und einer kond. $AM^{-/-}$ -Maus (KO). Die Signalstärke ist in den Neuronen der AM-gendefizienten Maus stark reduziert.

Es zeigte sich eine Reduktion des Signals in den Neuronen der kond. $AM^{-/-}$ -Mäuse. Die Signalstärke in den Wildtypmäusen war klar und deutlich. Ein Restsignal war jedoch auch in den Neuronen der kond. $AM^{-/-}$ Mäuse zu erkennen.

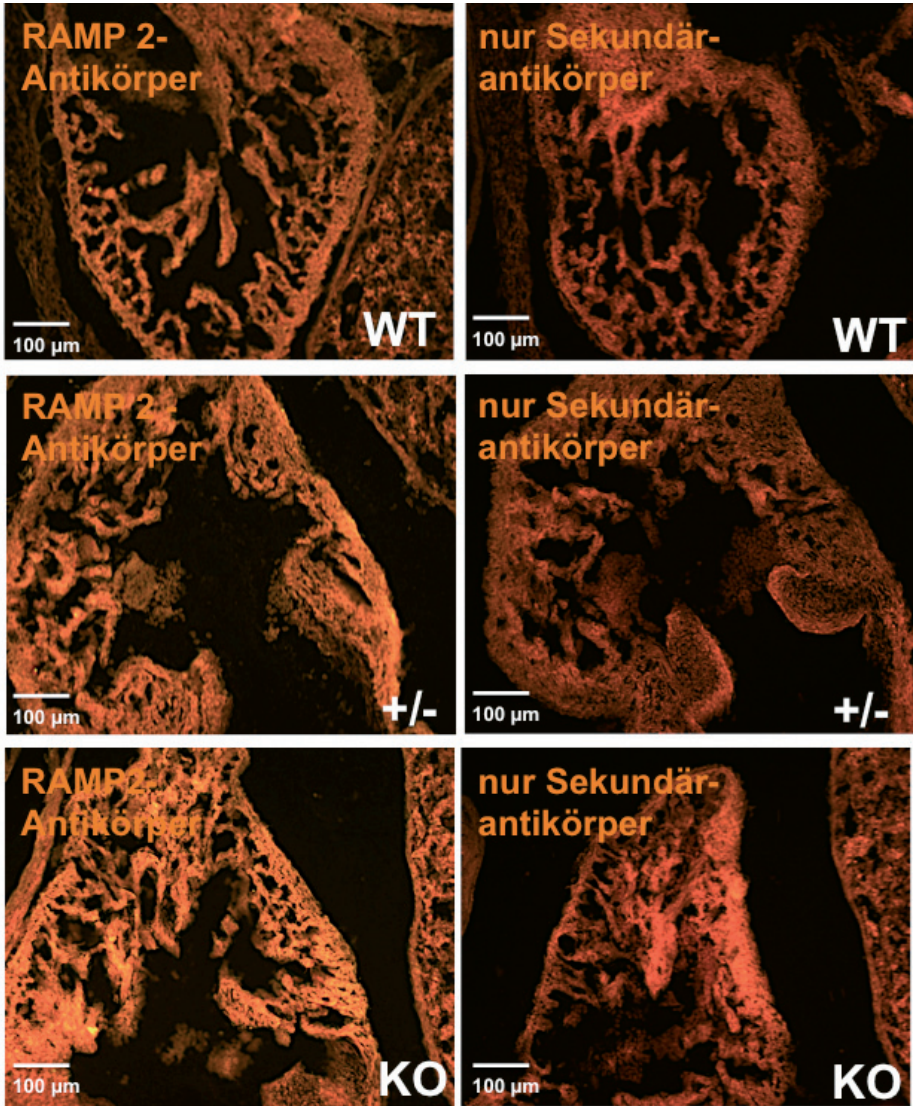


Abbildung 4. Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen RAMP2; Kardialer Ventrikel von Wildtyp- (WT), heterozygoten (+/-) und Knockout-Embryonen (KO). Jeweils links mit primärem und sekundärem Antikörper, rechts ohne Primärantikörper

Wir testeten Antikörper gegen RAMP1-3 aus. Hierbei konnten wir jedoch nur bei einem Antikörper gegen RAMP2 eine Reaktion erzielen. In der von uns durchgeführten Spezifitätskontrolle mit diesem Antikörper an Gewebe von RAMP2^{-/-}-Embryonen (Abb. 4) zeigte sich jedoch kein erkennbarer Unterschied zwischen der Immunreaktion bei Wildtyp und Knockout. Auf eine weitere Verwendung dieses Antikörpers wurde aufgrund dieser Ergebnisse verzichtet.

3.2 Bestimmung der mRNA-Expression von AM und AM2/IMD in verschiedenen Organen

Um einen Überblick über die mRNA-Expression von AM und AM2/IMD in verschiedenen Organen zu gewinnen, wurden von drei adulten männlichen Bl6-Mäusen insgesamt 20 verschiedene Organe entnommen und mittels Real-time RT-PCR auf die Menge an exprimierter AM bzw. AM2/IMD-mRNA hin untersucht.

Die Expression von AM in Relation zu der konstanten Menge mRNA des Housekeeping Gens MG zeigte sich sehr heterogen verteilt in den unterschiedlichen Organen (Abb. 5).

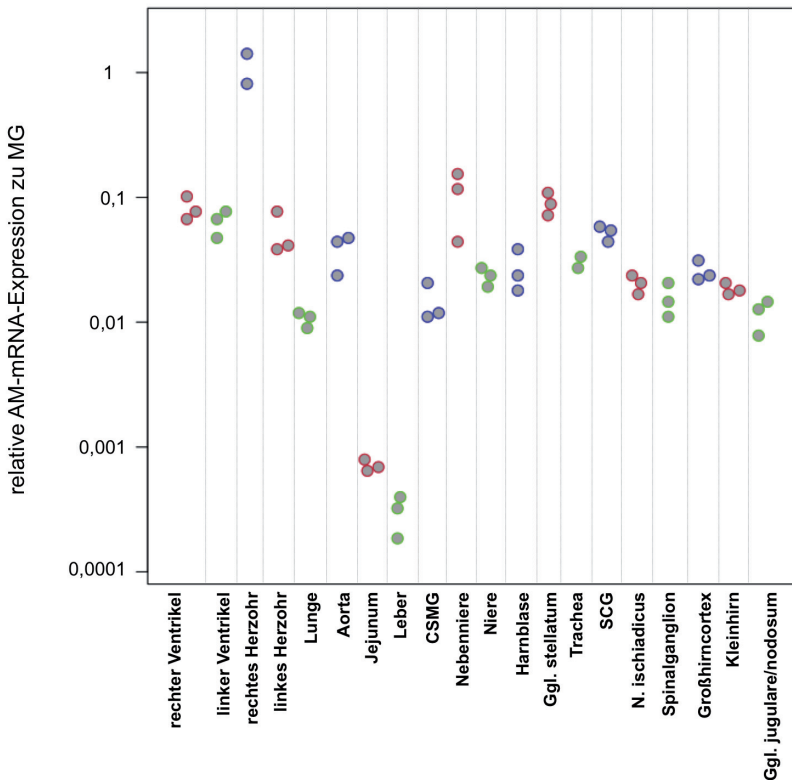


Abbildung 5. Real-time RT-PCR; Übersicht über die relative mRNA-Expression von AM in verschiedenen Organen. Jeder Messwert ist als farbiger Punkt dargestellt. CSMG=Ggl. coeliaco-mesentericum superius

Es zeigte sich, dass die AM-Expression im Herzen insgesamt sehr hoch ist. Die AM-mRNA-Expression war vor allem im rechten Herzohr mit $1,21 \pm 0,21$ (Mittelwert \pm Standardfehler) sehr stark, im linken Herzohr betrug die mittlere relative mRNA-Expression von AM jedoch nur $0,05 \pm 0,012$. Im linken ($0,06 \pm 0,01$) und rechten ($0,08 \pm 0,01$) kardialen Ventrikel lag die relative AM-mRNA-Expression in einem ähnlichen Bereich wie im linken Herzohr. Ähnlich den Befunden des kardialen Gewebes konnte auch in der Aorta der Mäuse eine starke Expression von AM-mRNA beobachtet werden ($0,04 \pm 0,01$). In Jejunum und Leber konnten nur sehr kleine Mengen an AM-mRNA detektiert werden, welche nicht klar von Artefakten zu unterscheiden waren. In unserem Organscreen konnten wir in der Lunge ebenfalls eine eher geringe Menge AM-mRNA detektieren ($0,01 \pm 0,001$). Als Beispiel für ein sympathisches prävertebrales Ganglion untersuchten wir die mRNA-Expression von AM und AM2/IMD im Ganglion coeliacum/mesentericum superius (CSMG). Hier lag die relative mRNA-Expression bei $0,02 \pm 0,003$. In der Niere und der Harnblase lag die relative mRNA-Expression bei $0,023 \pm 0,002$ bzw. bei $0,027 \pm 0,006$. Im Spinalganglion und im Ganglion jugulare/nodosum, als Beispiele für Ganglien mit pseudounipolaren sensiblen Neuronen, lag die relative AM-mRNA-Expression bei $0,02 \pm 0,0028$ und bei $0,01 \pm 0,002$. Großhirnkortex ($0,03 \pm 0,003$) und Kleinhirn ($0,02 \pm 0,001$) zeigten ebenfalls, wie der periphere N. ischiadicus ($0,02 \pm 0,002$), eine eher mittlere mRNA-Expression von AM. Betrachtet man Organe, die Teil des sympathischen Nervensystem sind, fiel auf, dass hier eine recht starke Expression zu sehen war, wie sonst nur in der Analyse der kardialen Proben. So lag die mittlere relative mRNA-Expression von AM in der Nebenniere bei $0,15 \pm 0,032$, in den paravertebralen Ganglien Stellatum und SCG bei $0,09 \pm 0,012$ und bei $0,05 \pm 0,004$.

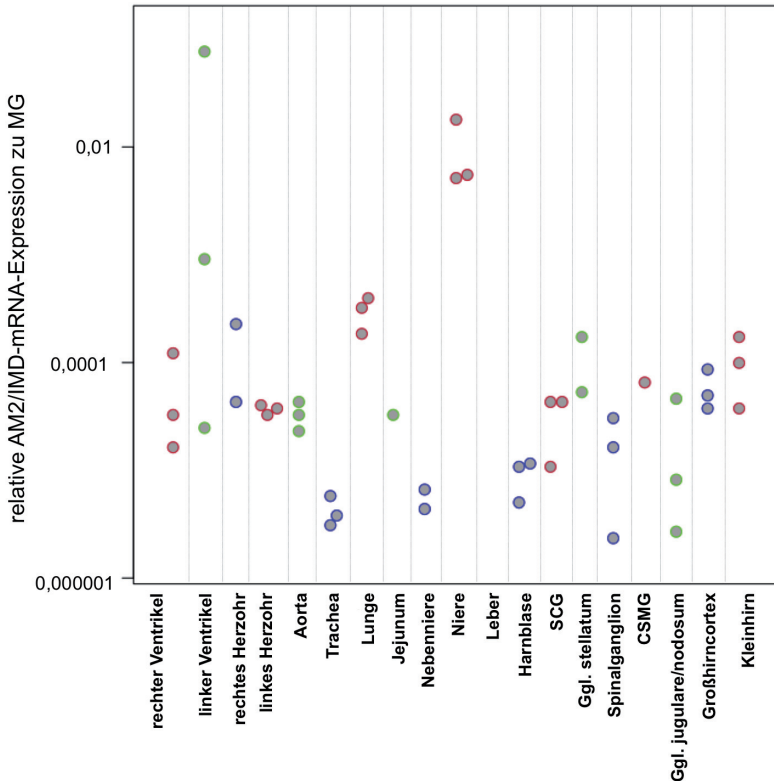


Abbildung 6. Real-time RT-PCR; Übersicht über die relative mRNA Expression von AM2/IMD in verschiedenen Organen. Jeder Messwert ist als farbiger Punkt dargestellt.

Bei der Betrachtung der relativen mRNA-Expression von AM2/IMD in verschiedenen Geweben in Relation zum Houskeeping Gen MG zeigte sich zunächst einmal, dass im Vergleich zu AM eine deutlich geringere mRNA-Expression in den einzelnen Organen bestand (Abb. 6). Eine Ausnahme bildete hierbei die Niere mit einer relativen AM2/IMD-mRNA-Expression von $0,01 \pm 0,004$, dies war der Maximalwert unter den untersuchten Organen. Das Organ mit der nächst höheren Expression war der linke Ventrikel, der mit $0,0005 \pm 0,0004$ nur circa 1/20 der AM2/IMD-Expression der Niere aufwies. Die anderen Teile des Herzens wiesen eine noch geringere relative mRNA-Expression auf. So hatte der rechte kardiale Ventrikel eine relative AM2/IMD mRNA-Expression von $0,00002 \pm 0,00001$, das rechte und linke Herzohr von $0,00014 \pm 0,00008$ und $0,00004 \pm 2,2 \cdot 10^{-6}$. In der Aorta war es uns nicht möglich, AM2/IMD-mRNA reproduzierbar zu detektieren, genauso wie im Jejunum, in der Leber und im N. ischiadicus. In der Harnblase lag die relative mRNA-Expression von

AM2/IMD bei $0,00001 \pm 2,1 \cdot 10^{-6}$ Die Trachea hatte eine höhere AM2/IMD mRNA-Expression ($0,00011 \pm 0,00005$) als die Lunge ($0,00003 \pm 0,00001$). In den sensorischen Ganglien bewegte sich die AM2/IMD-mRNA-Expression auf einem ähnlichen Niveau mit einer relativen Expression von 0,00007 im Spinalganglion und $0,0001 \pm 0,00004$ im Ganglion jugulare und nodosum. Im prävertebralen sympathischen Ganglion CSMG lag die relative AM2/IMD-Expression bei 0,00003 ($n=1$), in den paravertebralen sympathischen Ganglien im SCG bei $0,00002 \pm 0,00001$ und im Ggl. stellatum bei $0,00003 \pm 0,00001$. Die relative mRNA-Expression von AM2/IMD in der Nebenniere betrug $0,00001 \pm 1,13 \cdot 10^{-6}$. Im Kleinhirn ($0,00006 \pm 0,00001$) war die AM2/IMD mRNA-Expression circa dreifach höher als im Großhirnkortex ($0,00002 \pm 0,00001$). Es zeigte sich somit eine insgesamt eher schwache Expression von AM2/IMD in den verschiedenen Organen auf mRNA-Ebene unter physiologischen Bedingungen.

3.3 Messenger RNA-Expression von AM und AM2/IMD in verschiedenen Geweben nach einem Tag normobarer Hypoxie

Im Anschluss an die Analyse der Daten unter physiologischen Bedingungen erfolgte die Analyse der mRNA-Expression in verschiedenen Organen nach eintägiger Haltung der Tiere (n=4, männlich, adult, B16) bei normobarer Hypoxie (10% O₂). Die Ergebnisse (Abb. 7-12) sind als relative mRNA-Expression im Vergleich zu dem Houskeeping Gen MG dargestellt.

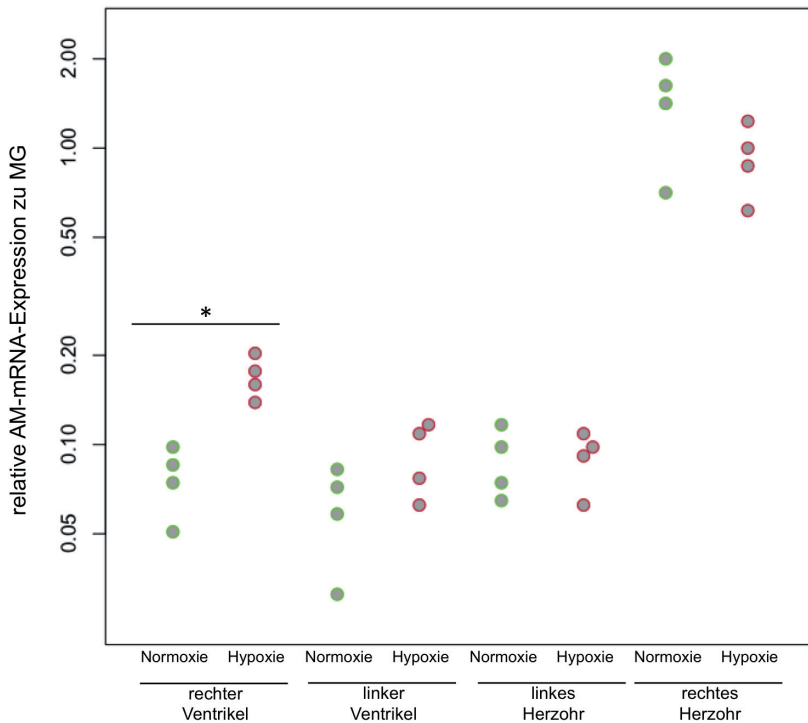


Abbildung 7. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Abschnitten des Herzens. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede sind bei $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) mit * markiert.

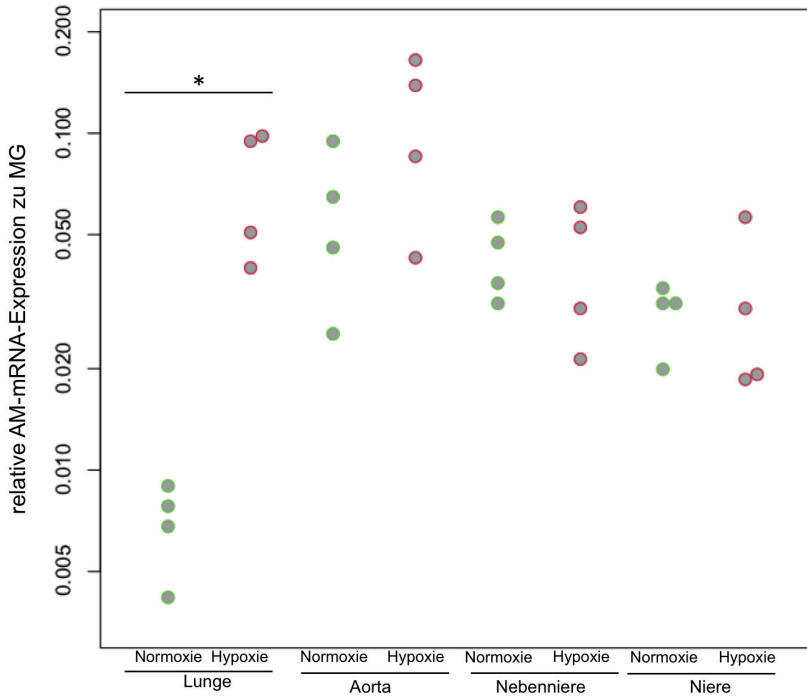


Abbildung 8. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede sind bei $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) mit * markiert.

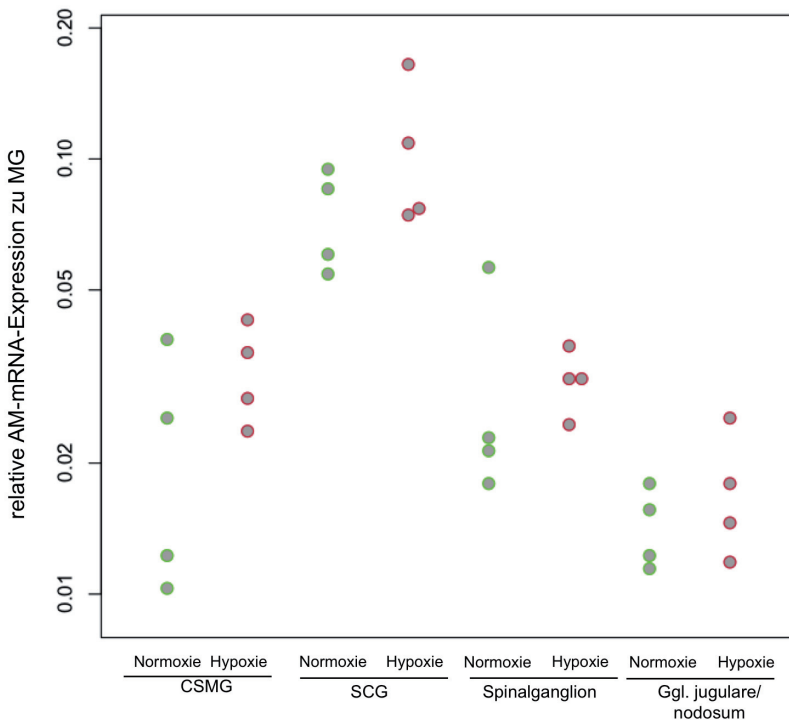


Abbildung 9. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Ganglien. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test)

Nach einem eintägigen Aufenthalt bei 10% Sauerstoffgehalt zeigte sich eine statistisch signifikant gesteigerte mRNA-Expression für AM im rechten kardialen Ventrikel um das $2,2 \pm 0,14$ fache ($p = 0,03$ Mann-Whitney-Test) und in der Lunge um das $10,2 \pm 2,15$ fache ($p = 0,04$, Mann-Whitney-Test). Die anderen untersuchten Organe zeigten keine signifikanten Änderungen in der mRNA-Expression von AM.

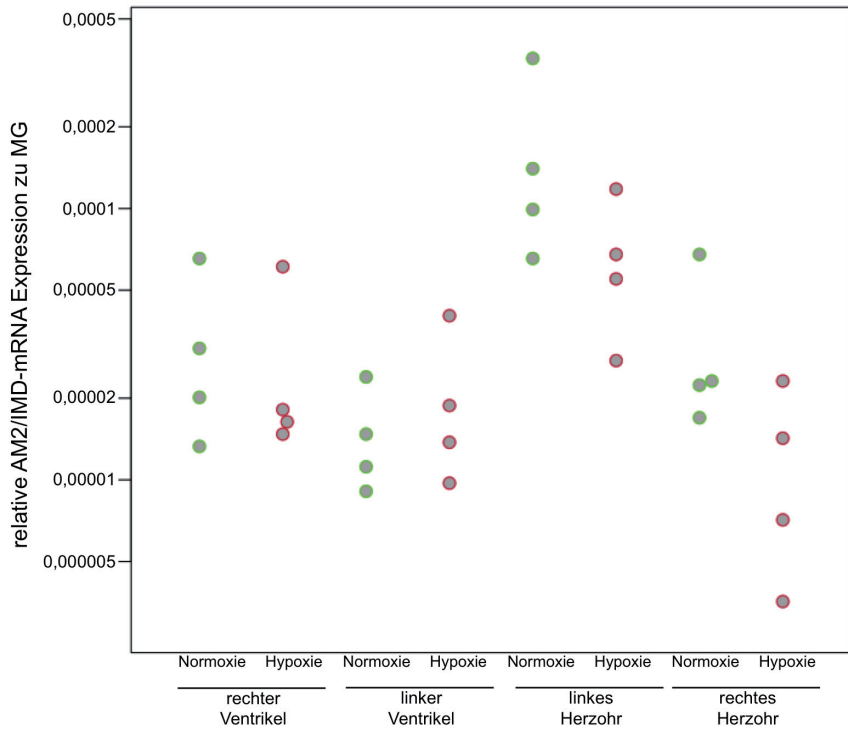


Abbildung 10. Real-time RT-PCR; AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Abschnitten des Herzens. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test)

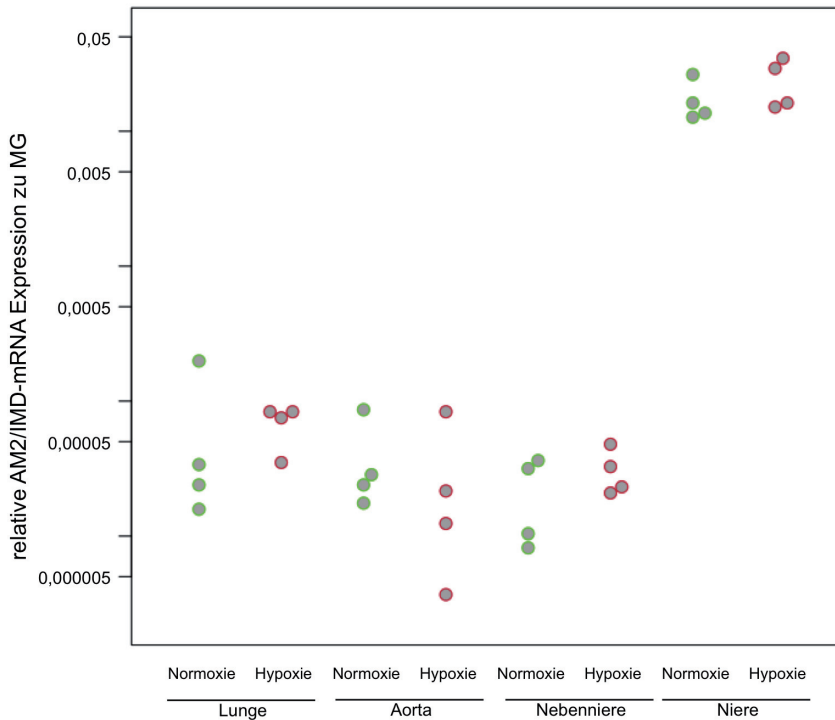


Abbildung 11. Real-time RT-PCR; AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test)

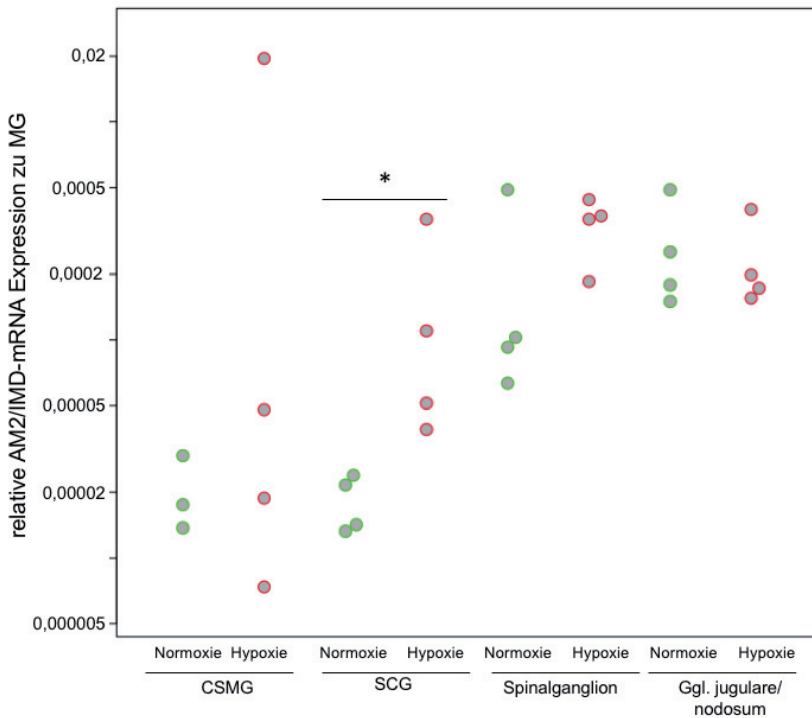


Abbildung 12 AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert.

Zu einer signifikanten Steigerung der mRNA Expression von AM2/IMD kam es nur im SCG ($7,6 \pm 4,07$) ($p = 0,04$, Mann-Whitney-Test).

3.4 Expression der CGRP-Peptidfamilie im SCG unter normobarer Hypoxie

In den initialen Screeningexperimenten zeigte sich, dass in sympathischen Ganglien sowohl AM als auch AM2/IMD unter Hypoxie auf mRNA-Ebene hochreguliert werden könnten. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Expressionsmuster der mRNA von AM, AM2/IMD, CGRP und dem dazugehörigen Rezeptorkomplex aus CLR und RAMP1-3 im SCG nach eintägiger Exposition der Mäuse (n=10, männlich, adult, Bl6) von normobarer Hypoxie mittels Real-time RT-PCR analysiert (Abb. 13 und 14).

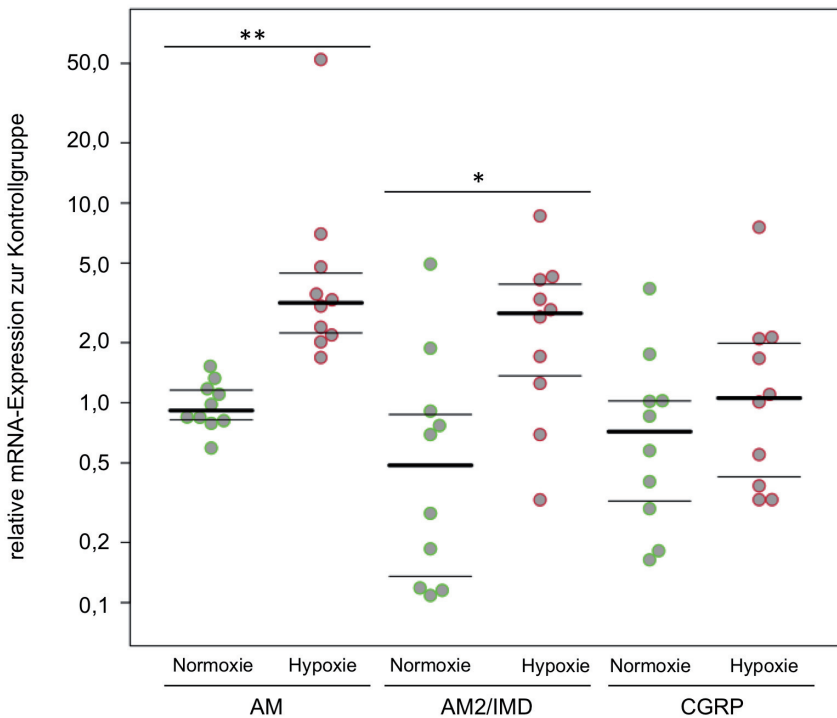


Abbildung 13. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression der CGRP-Peptidfamilie im SCG nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * und hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$, Mann-Whitney-Test) mit ** markiert.

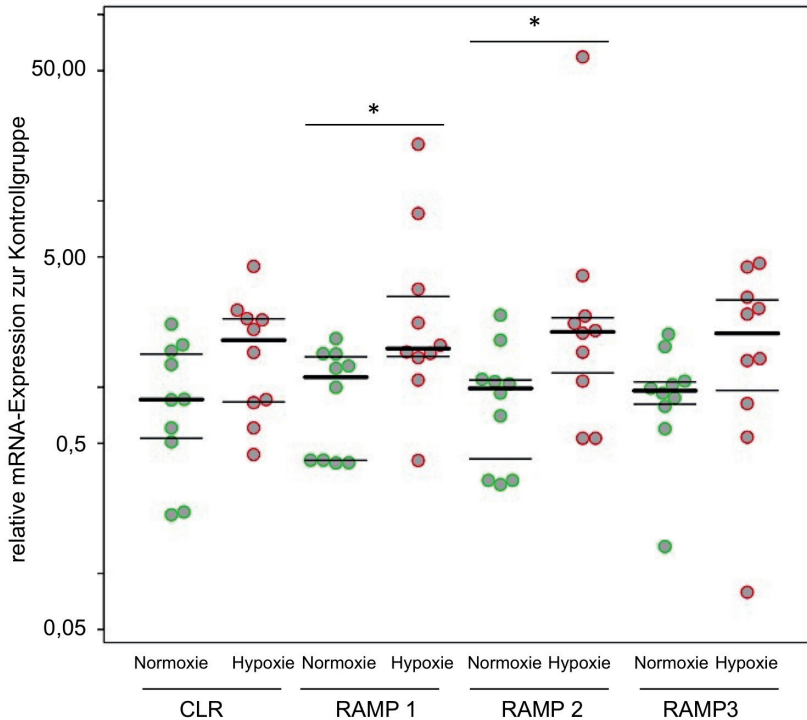


Abbildung 14. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression des CLR und der drei RAMPs im SCG nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert.

Nach eintägiger normobarer Hypoxie kam es im SCG zu einer hochsignifikanten Erhöhung ($p < 0,01$) der mRNA-Menge von AM ($8,2 \pm 4,92$). Darüber hinaus kam es zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der mRNA-Expression von AM2/IMD ($3,0 \pm 0,76$) sowie von RAMP1 ($4,2 \pm 1,92$) und RAMP2 ($7,5 \pm 5,75$). Für CGRP war die basale Expression bereits sehr gering und es kam zu keinem signifikanten Anstieg. Die Werte für CLR-mRNA lagen deutlich höher, es kam jedoch ebenso wie beim RAMP3 zu keiner signifikanten Erhöhung der mRNA-Menge.

3.5 Immunhistochemische Untersuchung der Expression der CGRP-Peptidfamilie, SCG

Um die Verteilung der einzelnen Peptide und des Rezeptorkomplexes zu untersuchen, wurden immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen (Abb. 15).

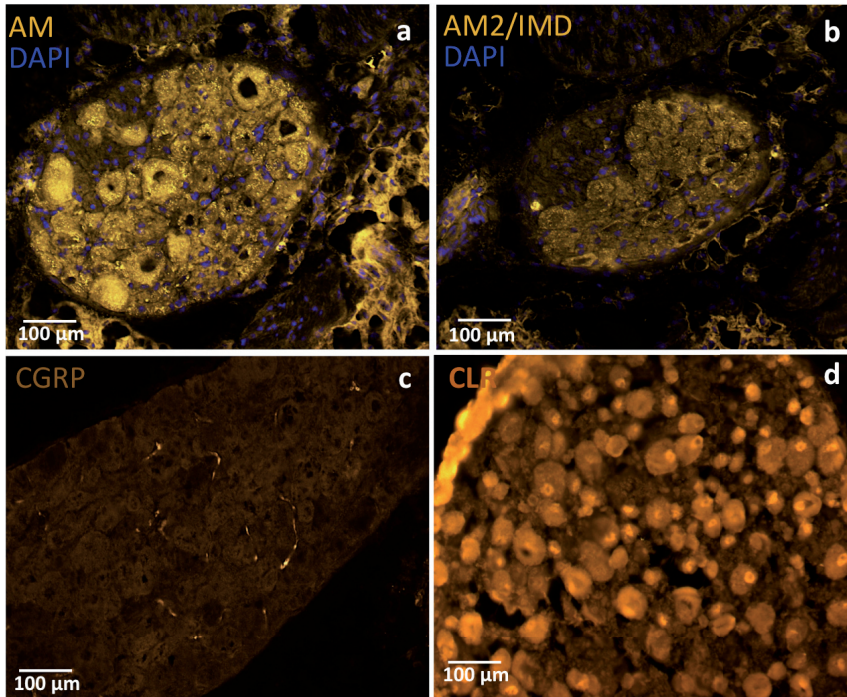


Abbildung 15. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen die Peptide AM (a) AM2/IMD (b) CGRP (c) und den CLR (d), SCG der Maus.

Die Immunhistochemie zeigte ein vorwiegend neuronales Vorkommen von AM (Abb. 15a) und AM2/IMD (Abb. 15b). Die Markierung mit dem AM2/IMD-Antikörper erschien jedoch schwächer zu sein als die mit dem AM-Antikörper. Die Markierung deutete bei beiden Peptiden auf eine subzelluläre Kompartimentierung hin. Für ein zytoplasmatisches Vorkommen zeigten sich keine Hinweise. Für CGRP zeigte sich keine Markierung der Nervenzellkörper, stattdessen wurden mit Antikörpern gegen CGRP vor allen Dingen Nervenfasern im SCG markiert (Abb. 15c). Der CLR-Antikörper (Abb. 15d) zeigte eine Markierung der Neurone, wobei vor allen Dingen eine zytoplasmatische Markierung zu erkennen ist, auffällig ist jedoch auch eine sehr starke Markierung der Zellkerne.

Im Weiteren wurde eine immunhistochemische Charakterisierung der CGRP-positiven Nervenfasern durchgeführt.

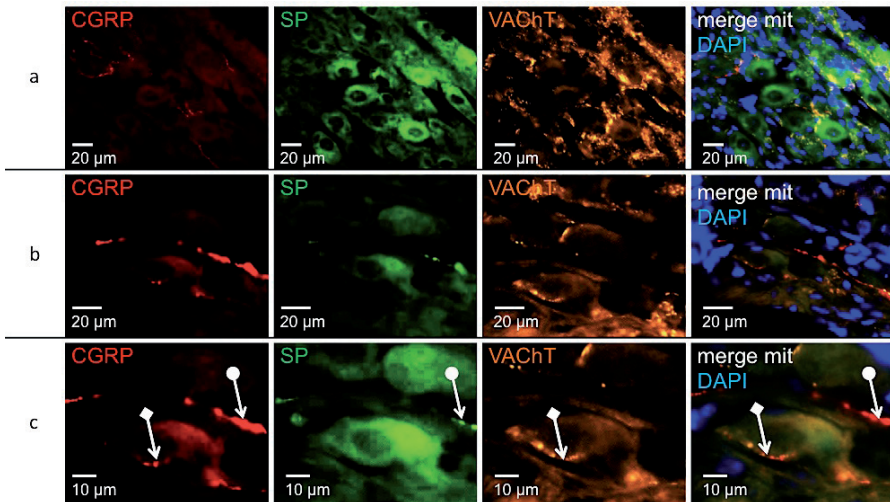


Abbildung 16. Immunhistochemische Charakterisierung der CGRP-positiven Nervenfasern im SCG mit Antikörpern gegen SP, gegen den vesikulären Acetylcholintransporter (VACht) und mit dem nukleären Marker DAPI. Die drei Zeilen zeigen aufsteigende Vergrößerungen (a,b,c). In den ersten drei Spalten sind jeweils die Aufnahmen mit den verschiedenen Filtern für die verschiedenen Markierungen zu sehen. In der letzten Spalte ist ein Überlagerungsbild aller drei Immunmarkierungen plus DAPI zu sehen. Die Pfeile mit Kugel zeigen auf eine SP- und CGRP-positive Nervenfaser, die Pfeile mit Raute auf eine cholinerge CGRP positive-Nervenfaser.

Die nähere Charakterisierung der Nervenfasern innerhalb des SCG, welche positiv mit Antikörpern gegen CGRP markiert wurden, zeigte, dass es sich zumindest um zwei verschiedene Typen von Nervenfasern handelte (Abbildung 16). Zum einen fanden sich solche, die zusätzlich zur Markierung mit dem CGRP-Antikörper auch eine Markierung durch den SP-Antikörper aufwiesen (Abb. 16c Pfeil mit Kugel), zum anderen solche, die sich neben der Markierung mit dem CGRP-Antikörper auch durch einen Antikörper gegen den vesikulären Acetylcholintransporter (VACht) markieren ließen (Abb. 16c Pfeil mit Raute).

Es fiel zusätzlich auf, dass die VACht-positiven CGRP-Fasern häufig sehr stark in der Nähe der Nervenzellkörper im SCG zu finden waren, während die SP-positiven Fasern keine so enge räumliche Assoziation zu den Nervenzellkörpern aufwiesen (Abb. 16c).

Um weiter zu untersuchen, ob es präganglionäre, cholinerge Neurone gibt, die CGRP-positiv sind, wurden zunächst Nervenquetschungsversuche am sympathischen Grenzstrang durchgeführt. Hierbei kommt es im Bereich der Quetschung zu einer Akkumulation von Stoffen, die einem axonalen Transport unterliegen. Dadurch ist es möglich, Stoffe

nachzuweisen, die in einer herkömmlichen immunhistochemischen Untersuchung des Nervens nicht darstellbar wären.

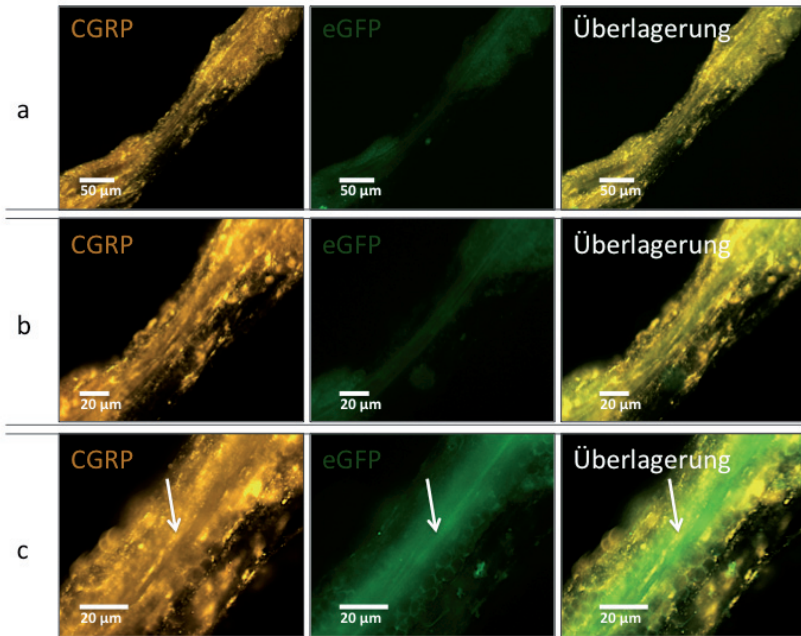


Abbildung 17. Immunhistochemie am Ganzpräparat eines sympathischen Halsgrenzstrangs einer ChAT-eGFP-Maus nach Nervenquetschung. In den verschiedenen Zeilen sind aufsteigende Vergrößerungen (a,b,c) gezeigt. In der ersten Spalte ist die Antikörpermarkierung gegen CGRP gezeigt, in der zweiten Spalte eGFP-Fluoreszenz. In der dritten Spalte sieht man die Überlagerung beider Signale. Der Pfeil zeigt auf eine doppelt positive Nervenfaser.

Die Nervenquetschversuche wurden an ChAT eGFP-Mäusen durchgeführt. Man erkennt, dass es zu einer Anreicherung von CGRP im sympathischen Grenzstrang kam (Abb. 17). Man erkennt ebenfalls, dass sich eGFP im sympathischen Grenzstrang nach Nervenquetschung anreicherte (Abb. 17). Die Betrachtung legt nahe, dass es eine Kolo-kalisation gab (Bsp. siehe Pfeil Abb. 17c). Allerdings ist durch das unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster des zytoplasmatischen eGFP und des vesikulären CGRP keine sichere Aussage zu treffen.

Als weitere Untersuchung zur Expression von CGRP in präganglionären sympathischen Neuronen führten wir Immunhistochemie mit Antikörpern gegen CGRP an Schnitten des thorakalen Rückenmarks von ChAT-eGFP-Mäusen durch.

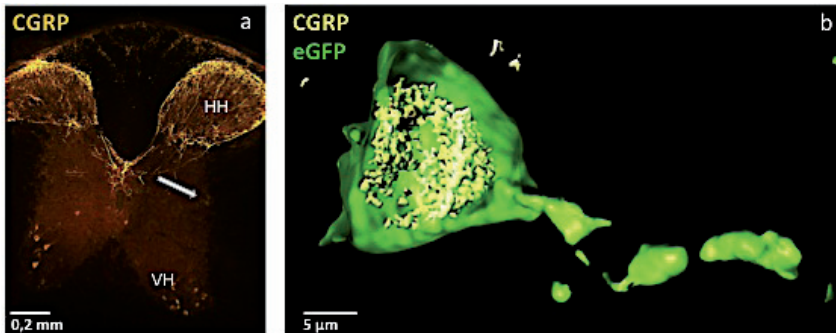


Abbildung 18. a) Rückenmark mit CGRP-Immunreaktion, Epifluoreszenzmikroskopie, HH markiert das Hinterhorn, VH das Vorderhorn, der Pfeil zeigt auf Zellen des Seitenhorns. In b) ist ein Seitenhornneuron einer ChAT-eGFP-Maus mit Hilfe des CLSM dargestellt und dreidimensional rekonstruiert. In gelb ist die Antikörpermarkierung des CGRP zu sehen, in grün das eGFP-Signal.

CGRP ist im Rückenmark sehr stark in sensorischen Fasern im Hinterhorn enthalten (Abb. 18a). Zusätzlich sind es im Vorderhorn vor allen Dingen Motoneurone, die CGRP-immunreaktiv sind. Vor dem Hintergrund dieser stark CGRP-positiven Strukturen ist die Immunreaktion für CGRP in den präganglionären Neuronen (siehe Abb. 18a Pfeil) kaum vom Hintergrund zu unterscheiden. Um die Überlagerung des Fluoreszenzsignals in der Z-Ebene zu minimieren und so eine CGRP-Immunreaktion im Bereich des Signals des eGFP zeigen zu können, wurden konfokal-mikroskopische Aufnahmen mit Hilfe des CLSM durchgeführt und die Bilder mittels der Imaris-Software zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion verarbeitet. Hierbei wurden Rückenmarksproben einer ChAT-eGFP Maus mit Antikörpern gegen CGRP inkubiert (Abb. 18b). Dadurch war es möglich, die präganglionären Neurone im Seitenhorn des Rückenmarks aufzufinden. Das dargestellte Neuron ist ein Beispiel für ein präganglionäres, cholinerges Neuron, welches sich als CGRP-positiv erwies. Man erkennt deutlich, dass die CGRP-Immunreaktion innerhalb der Zelle lag.

3.6 Expression direkt hypoxieregulierter Gene im SCG nach eintägiger Tierhaltung in normobarer Hypoxie

Nach eintägiger Haltung von B16-Mäusen in Hypoxie zeigte sich, dass es in der Lunge unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen zu einem deutlichen Anstieg der mRNA von TrkB ($34,9 \pm 4,6$) und von Endothelin 1 ($19,3 \pm 1,6$) kam ($p < 0,05$).

Die SCG derselben Versuchstiere zeigten keinen signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentration von TrkB und Endothelin 1 (Abb. 19).

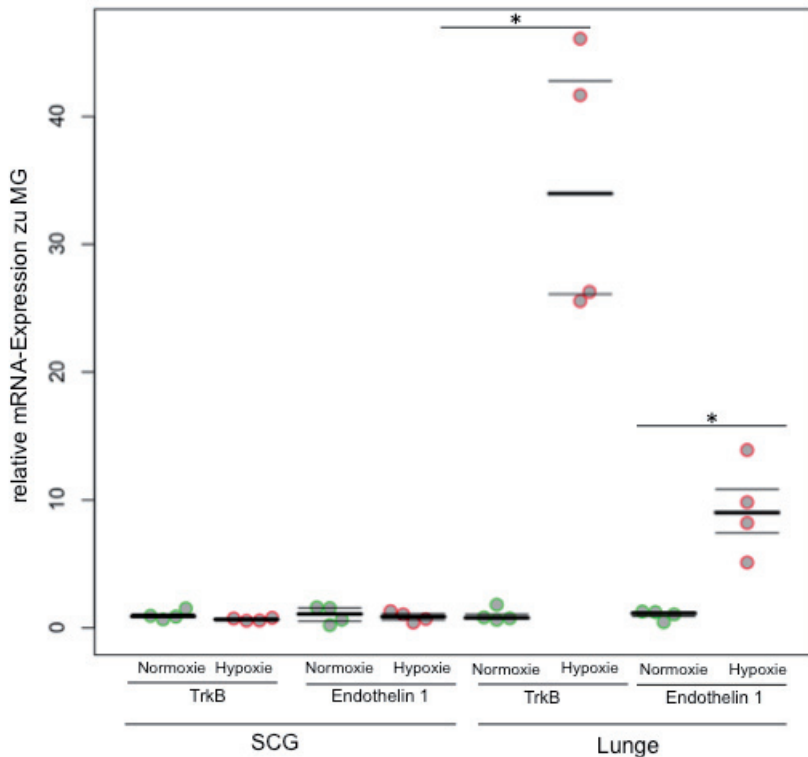


Abbildung 19. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression von TrkB und Endothelin 1 nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert.

3.7 Beeinflussbarkeit der AM-Expression durch präganglionären Einfluss.

3.7.1 Basalexpression in Bl6-, M1^{-/-} und tabac-Mäusen

Die Basalexpression der mRNA von AM, AM2, CGRP und den drei RAMPS wurde mittels Real-time RT-PCR in diesen beiden genetisch veränderten Mausstämmen analysiert und mit der Expression in Bl6-Mäusen verglichen (Abb.20).

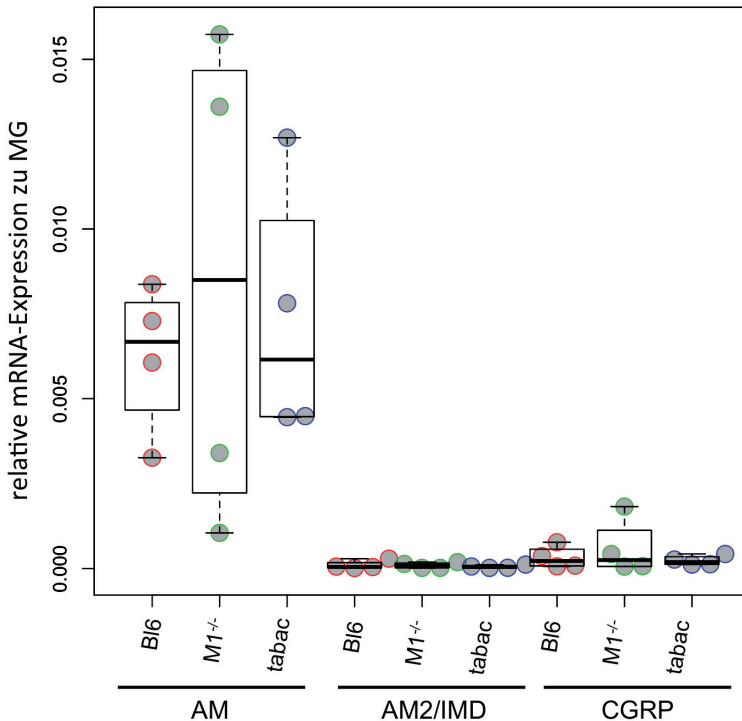


Abbildung 20. Real-time RT-PCR; Basalexpression der mRNA der Mitglieder der CGRP-Peptidfamilie, im SCG von Bl6-, M1^{-/-} und tabac-Mäusen. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Messwerte angezeigt. Ein Boxplot ist überlagert. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

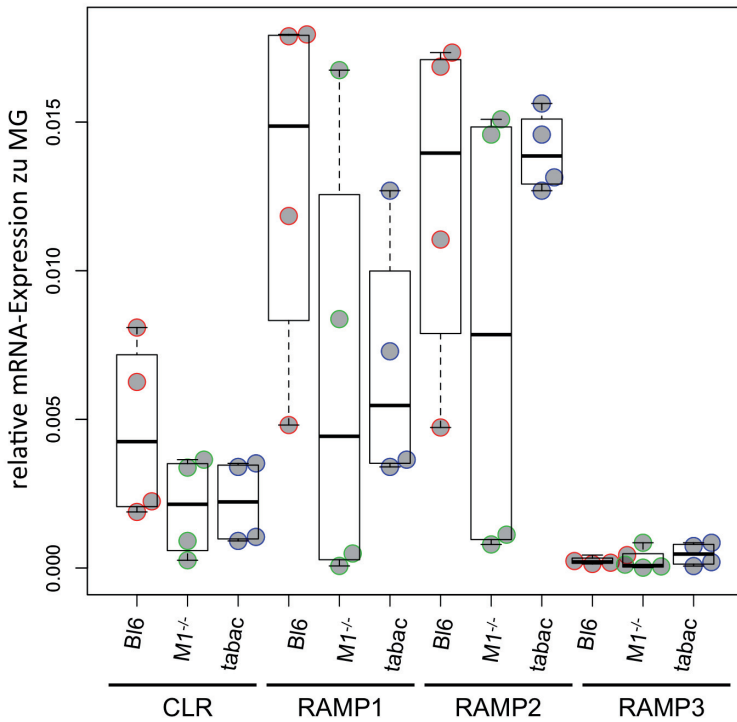


Abbildung 21. Real-time RT-PCR; Basalexpression der mRNA des des CLR und der drei RAMPs in SCG von Bl6-, M1^{-/-} und tabac-Mäusen. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Werte angezeigt. Ein Boxplot ist überlagert. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

Es zeigte sich, dass die basale mRNA-Expression im Bezug auf die betrachteten Peptide keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Mausstämmen aufwies ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

3.7.2 Versuche mit EFS zur Regulation von AM und AM2/IMD

Um nicht nur die basalen Bedingungen zu überprüfen, sondern auch die Situation einer präsynaptischen Aktivierung, wurde eine präsynaptische Aktivierung in kultivierten SCG durch EFS nachgestellt (Abb. 21 & 22).

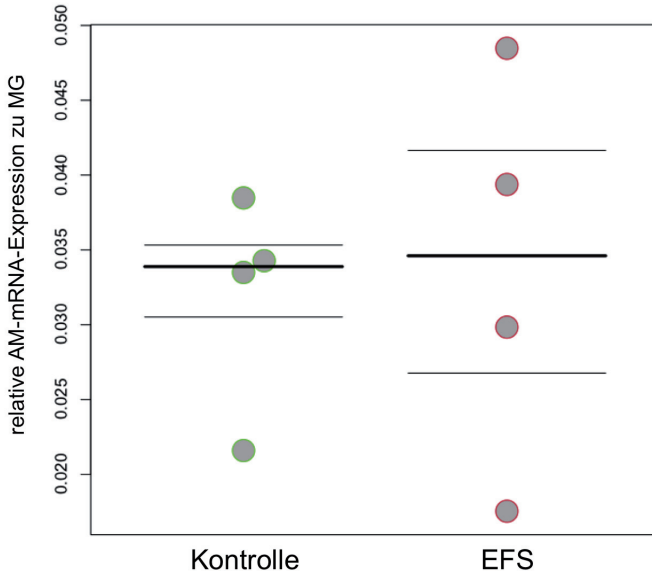


Abbildung 22. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression von AM unter Kontrollbedingungen und nach EFS von explantierten SCG. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,81$, Mann-Whitney-Test).

Die Kontrollgruppe hatte einen mittleren relativen AM-mRNA-Wert in Relation zu MG von $0,03 \pm 0,004$. In der mit EFS behandelten Gruppe lag die mittlere relative AM mRNA-Expression bei $0,03 \pm 0,007$. Durch die EFS kam es somit zu keinem Anstieg der mRNA-Expression von AM ($p=0,81$, Mann-Whitney-Test).

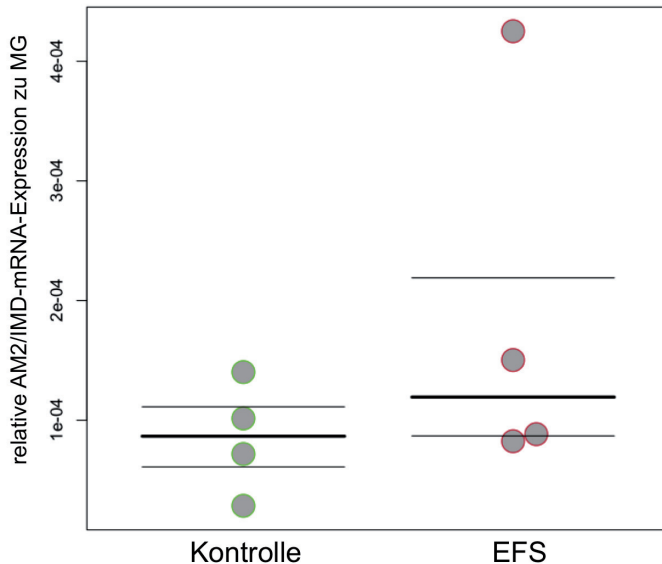


Abbildung 23. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression von AM2/IMD unter Kontrollbedingungen und nach EFS von explantierten SCG. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,28$, Mann-Whitney-Test).

In der nicht stimulierten Kontrollgruppe lag die mRNA-Expression von AM2/IMD in Relation zu MG bei $0,00009 \pm 0,00002$, in der EFS-Gruppe bei $0,00019 \pm 0,00008$. Der hohe Mittelwert in der mRNA-Expression nach EFS entstand allerdings nur durch einen einzelnen sehr hohen Wert, der mehr als zwei Standardabweichungen ausmacht (Median: $8.83e-05$ Kontrolle; $11,9383e-05$ EFS). Insgesamt kam es nicht zu einer Steigerung der mRNA-Expression durch EFS ($p=0,28$, Mann-Whitney-Test).

3.8 Expression von AM in isolierten SCG nach pharmakologischer Stimulation

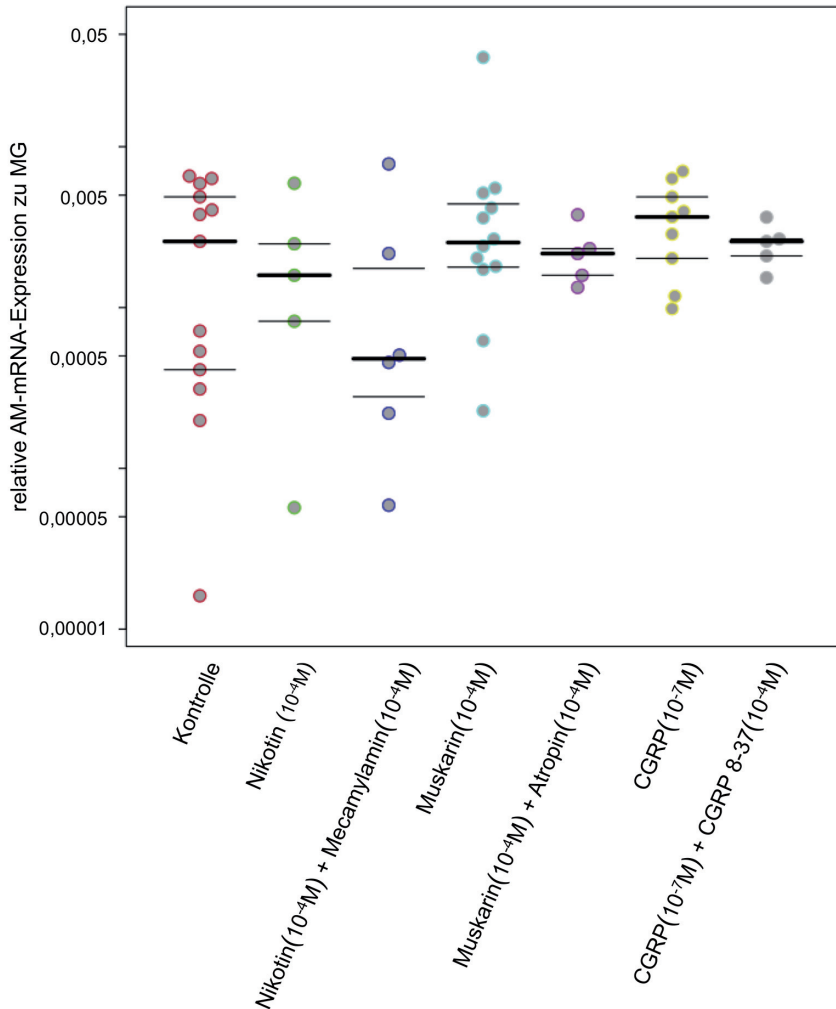


Abbildung 24. Real-time RT-PCR; rel. mRNA-Expression von AM nach pharmakologischer Stimulation von explantierten SCG. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test).

Nachdem die elektrische Stimulation nicht zu einem Anstieg in der mRNA-Expression von AM führte, wurde versucht, eine differenzierte pharmakologische Stimulation vorzunehmen (Abb. 24). Hierbei wurden sowohl die cholinerge Transmission als auch die peptiderge Transmission durch CGRP nachgeahmt.

Weder eine Stimulation mit Nikotin ($0,002 \pm 0,001$, $p=0,76$, Mann-Whitney-Test), noch eine mit Muskarin ($0,005 \pm 0,003$, $p=0,65$, Mann-Whitney-Test) oder CGRP ($0,004 \pm 0,00$, $p=0,32$, Mann-Whitney-Test) führte zu einer signifikanten Veränderung in der mRNA-Expression von AM im Vergleich zur Kontrolle ($0,003 \pm 0,001$).

Auch die Zugabe von Antagonisten von nikotinischen (Mecamylamin), muskarinischen (Atropin) und CGRP-Rezeptoren (CGRP 8-37) führte nicht zu einer signifikanten Änderung der relativen AM mRNA-Expression im SCG.

3.9 Effekt von AM auf den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Gabe von Nikotin in isolierten SCG-Neuronen

Um die Wirkung von AM auf die synaptische Transmission zu testen, wurden sympathische Neurone aus dem SCG isoliert und die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration auf Nikotingabe mit und ohne Vorbehandlung mit AM untersucht.

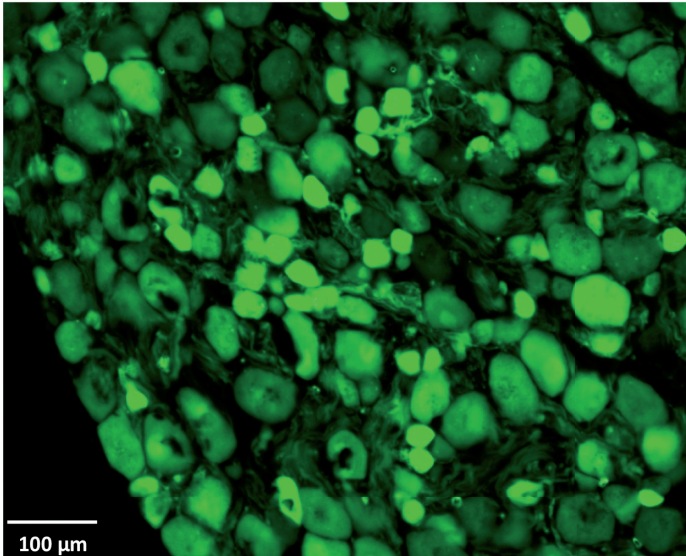


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; SCG einer tabac-Maus mit einem Filter zur eGFP-Darstellung

Für die Versuche zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden SCG von tabac-Mäusen verwendet. In Abb. 25 erkennt man deutlich, dass die SCG-Neurone dieses Mausstammes eine deutliche GFP-Expression aufwiesen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde dieser Mausstamm ausgewählt, um nach erfolgter Dissoziation der Neurone diese identifizieren zu können.

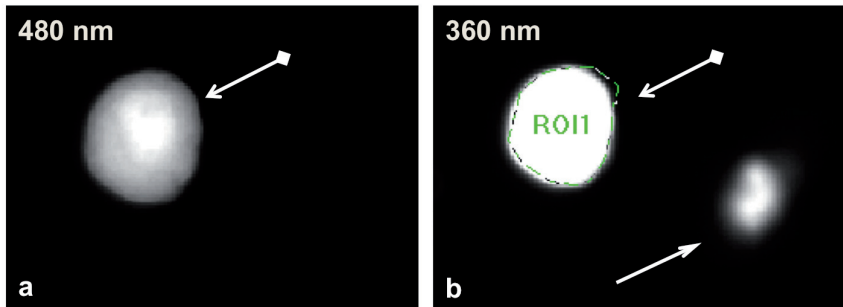


Abbildung 26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; isolierte Zellen des SCG einer tabac-Maus. In a Darstellung des GFP-Signals, in b Darstellung des Signals von Fura-2, mit dem eingezeichneten Messbereich der Fluoreszenz („region of interest“ (ROI)). Der Pfeil mit Raute zeigt auf ein Neuron, der normale Pfeil auf eine nicht-neuronale Zelle.

Nach der Isolation der SCG-Neurone erkannte man, dass es sehr viele Strukturen gab, welche mit Fura-2 beladen wurden und morphologisch nicht sicher von Neuronen zu diskriminieren waren (Abb. 26b Pfeil). Die Identifikation der Neurone und daraus folgend die richtige Auswahl des Messbereichs gelang dennoch durch das GFP-Signal der Neurone (Abb. 26a und b Pfeil mit Raute).

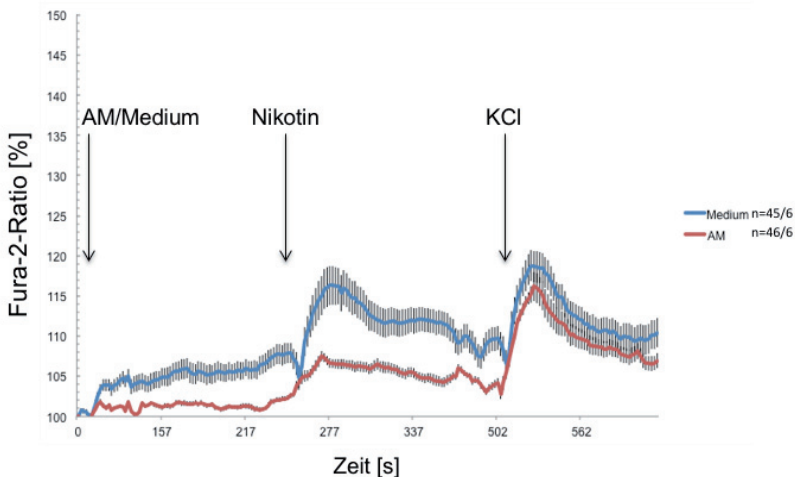


Abbildung 27. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zu sehen ist die gemessene Ratio der Fura-2-Fluoreszenz bei Anregung mit 340 bzw. 380 nm. In rot ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen dargestellt, zu deren Medium initial AM in einer Konzentration von 10^{-8} M gegeben wurde (46 Zellen aus 6 Versuchen; $n=46/6$), in blau Mittelwert \pm Standardabweichung der Kontrolle nach Zugabe von Medium ($n=45/6$). Die Konzentration des Nikotins war 10^{-4} M, KCl wurde in einer Konzentration von 10^{-3} M gegeben.

Die Messungen zeigten, dass AM in der gewählten Konzentration keinen Effekt auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration hatte. Die Gabe von Nikotin bewirkte einen starken, schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Darüber hinaus erkennt man, dass die Zellen nach Depolarisation durch Gabe von KCl - als Kontrolle – ebenfalls mit einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten (Abb. 27).

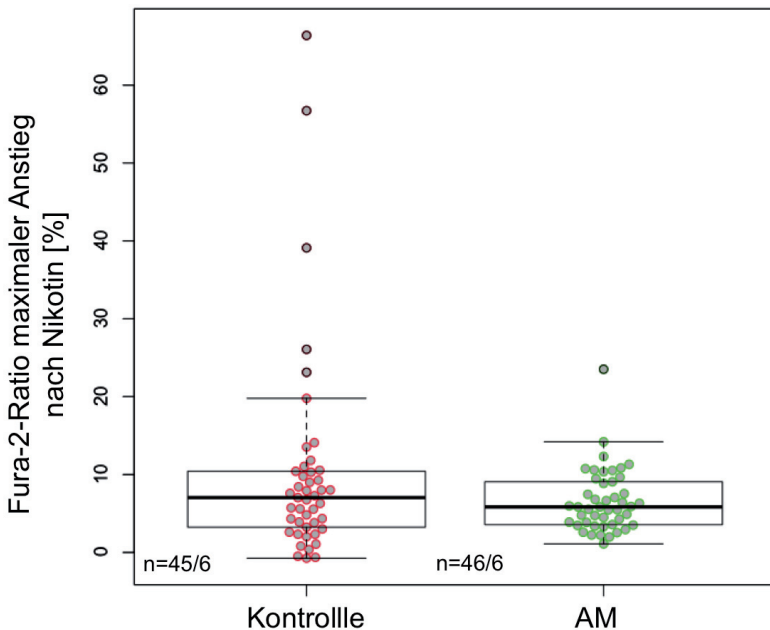


Abbildung 28. Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Nikotingabe. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Werte angezeigt Ein Boxplot ist überlagert. Der Kontroll-Gruppe wurde Medium anstelle von AM (10^{-9} M) 240 Sekunden vor der Nikotinstimulation zugegeben. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test). Analysiert wurden $n=45/6$ und $46/6$, d.h. 45 bzw. 46 Zellen aus 6 verschiedenen Versuchen.

Die AM-Vorbehandlung hatte darüber hinaus keinen signifikanten Einfluss auf die durch Nikotin induzierte Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($p=0,58$). Die Streuung in der Gruppe mit Zugabe von Medium ($10,28 \pm 13,47$) war jedoch höher als in der Gruppe mit Zugabe von AM ($6,60 \pm 4,05$).

4 Diskussion

4.1 Verteilung von AM und AM2/IMD in verschiedenen Organen

In Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine quantitative Übersicht über die mRNA-Expression von AM und AM2/IMD in den verschiedenen Organen der Maus erstellt. Ein Verteilungsmuster der Peptid-Expression in verschiedenen Organen der Ratte wurde bereits beschrieben (Sakata et al. 1994). Eine Gemeinsamkeit ist die hohe Expression im Herzen auf Vorhofebene und die relativ niedrige Expression auf Ventrikelebene. Ein deutlicher Unterschied ist, dass in der Ratte auf Peptidebene die stärkste Expression von AM in der Lunge zu finden war, während in dieser Arbeit die Ergebnisse der Analyse der mRNA eine deutlich geringere Expression nahelegen würden. Eine weitere Arbeit führte einen qualitativen Vergleich der mRNA-Expression sowohl von AM als auch von AM2/IMD in verschiedenen Organen der Maus durch (Takei et al. 2004). Hierbei zeigte sich, zumindest semiquantitativ in der Stärke der Gelbanden, eine Parallele zu den von uns gemessenen Ergebnissen im Bezug auf die schwächere Expression von AM2/IMD im Vergleich zu AM. Im Gegensatz zu den Daten der Peptidexpression der Ratte war auch hier die mRNA-Expression von AM in der Lunge eher gering ausgeprägt. Die starke Expression von AM2/IMD in der Niere wurde ebenfalls durch andere Quellen bestätigt und scheint hier funktionell eine wichtige Rolle in der Regulation der Nierenperfusion zu spielen (Fujisawa et al. 2004; Roh et al. 2004).

Die geringe Menge von AM-mRNA in der Lunge und auch die von AM2/IMD-mRNA stehen im Widerspruch zu den zum Teil sehr hohen Mengen an Peptid, die in der Literatur beschrieben wurden (Ramos et al. 2014), darüber hinaus ist es bemerkenswert, dass AM trotz seiner wichtigen Funktion in der Lunge (Caron & Smithies 2001) nur schwach exprimiert wurde.

Bei den von uns gezeigten quantitativen Daten ist allerdings die Einschränkung zu sehen, dass es sich um eine reine mRNA-Expressionsanalyse handelt. Man muss demnach bedenken, dass eine mögliche Regulation auf Peptidebene von den hier gezeigten Messungen unbemerkt bleiben würde. Eine weitere Einschränkung ist darin zu sehen, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Daten ausschließlich auf die Maus beziehen. Dies ist insofern eine deutliche Einschränkung, als sich die in humanen Proben gemessenen Peptidkonzentrationen zum Teil deutlich von anderen Spezies unterscheiden, ferner findet man erhebliche Unterschiede zu den dortigen Expressionsmustern in den einzelnen Geweben (Kitamura et al. 1994).

Für die Analyse der Expressionsänderungen von AM und AM2/IMD ist die Verwendung eines Tiermodells jedoch aufgrund der erforderlichen Hypoxieversuche nicht zu umgehen, weswegen diese Einschränkung in Kauf genommen werden musste.

AM wurde erstmals aus dem Gewebe eines Phäochromozytoms isoliert (Kitamura et al. 1993), einem Tumor, der aus dem Nebennierenmark entammt und somit ontogenetisch dem sympathischen Nervensystem zuzuordnen ist. Darüber hinaus zeigte AM einen deutlichen Einfluss auf präsympathische Zentren im Hypothalamus und scheint in Regulationsprozesse der kardialen Aktivität involviert zu sein (Hosokawa et al. 2010). AM zeigte ebenfalls eine neuromodulatorische Wirkung über Kalziumkanäle in Hirnstammneuronen (Fan et al. 2006). Trotz der vielen Hinweise für eine mögliche Rolle von AM in den Regulationsmechanismen des sympathischen Nervensystems wurde ein Vorkommen von AM in sympathischen Ganglien bislang nicht beschrieben.

In dieser Arbeit konnte jedoch eine starke mRNA-Expression sowohl im SCG als auch im Ggl. stellatum der Maus detektiert werden.

Von methodischer Seite betrachtet ist die Analyse der verschiedenen murinen Proben auf ihren AM- und AM2/IMD-mRNA-Gehalt hin als unkritisch zu bewerten. Die verwendete quantitative Real-time RT-PCR hat eine sehr hohe Spezifität (Savli et al. 2004), aber auch unsere internen Kontrollen – mit Schmelzkurvenanalyse, PCR-Analyse von Proben ohne reverse Transkriptase und Ansatz der PCR ohne cDNA – bestätigten die gute Spezifität der PCR trotz der geringen Mengen der analysierten mRNA.

4.2 Verteilung der Peptide der CGRP-Peptidfamilie im SCG

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CGRP, AM, AM2/IMD sowie der CLR im SCG von Mäusen sowohl auf Peptid- als auch auf mRNA-Ebene zu finden sind. Die drei RAMPs konnten nur auf mRNA-Ebene im SCG nachgewiesen werden. Die Expression von CGRP in sympathischen paravertebralen Ganglien im Allgemeinen und speziell im SCG wurde bereits vielfach beschrieben, jedoch in der Katze, im Meerschweinchen und in der Ratte (Kummer & Heym 1988; Kummer et al. 1989; Kummer & Heym 1991; Zaidi & Matthews 2013; Heym et al. 1993).

Eine Arbeit beschreibt die Expression des CLR im SCG von Mäusen. Dort wurde allerdings die Expression eines V5-Tag untersucht, der an CLR gekoppelt war, welches unter dem Promotor von Smooth-Muscle-Actin exprimiert wird. Dieses Tag wurde dort ebenfalls im SCG nachgewiesen (Kunz et al. 2007).

Generell ist die neuronale Expression von CGRP im SCG der Maus nur sehr schwach und eine CGRP-Expression in SCG-Neuronen von Nagern wurde bislang nur in der Ratte beschrieben (Zaidi & Matthews 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit waren wir leider nicht in der Lage, AM, AM2/IMD und CGRP nach Hypoxieexposition auf Peptidebene zu quantifizieren. Dies wäre eine interessante Untersuchung, da CGRP als Peptid in zahlreichen Nervenfasern im SCG zu finden ist. Diese Tatsache wurde bereits für andere Spezies in der Literatur beschrieben (Kummer & Heym 1988) und konnte von uns im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. CGRP-positive Nervenfasern in sympathischen Ganglien können unterschiedlicher Herkunft sein. Zum einen gab es solche, die neben CGRP auch SP enthielten, zum anderen eine Subpopulation, die neben CGRP kein SP enthielten. Frühere Arbeiten legen nahe, dass die SP-negativen Nervenfasern zum Teil präganglionären Ursprungs sind und im Ganglion stellatum synaptische Verbindungen mit ganglionären Neuronen ausbilden (Heym et al. 1993). In dieser Arbeit machten wir im SCG der Maus ähnliche Beobachtungen. Wir fanden in der Hauptsache zwei Typen von Nervenfasern mit CGRP-Gehalt: zum einen solche, die SP-positiv waren und in der Regel in der Peripherie des Ganglions zu finden waren, zum anderen cholinerge Fasern, die zumeist Faserkörbe um einzelne Neurone bildeten.

Da alle präganglionären Nervenfasern cholinerg sind, werteten wir diese als CGRP enthaltende, präganglionäre Nervenfasern. Die CGRP-haltigen Nervenfasern, welche ebenfalls immunreaktiv für SP waren, identifizierten wir auf Grundlage der bekannten Literatur als sensorische Nervenfasern (Wiesenfeld-Hallin et al. 1984)

Die immunhistochemischen Untersuchungen sowohl im SCG als auch im Rückenmark und an Nervenquetschungspräparaten des sympathischen Halsgrenzstrangs gaben einen Hinweis, dass die cholinergen CGRP-positiven Nervenfasern im SCG präganglionären Ursprungs sind und CGRP durch axonalen Transport in den Axonen des Halsgrenzstrangs in

die Nervenendigungen im SCG gelangt. Diese Vermutung wurde bereits nach Untersuchungen von sympathischen Ganglien des Meerschweinchens geäußert (Heym et al. 1993). Eine Bestätigung zeigte sich in den Daten von Ratten, in denen nach Colchicinapplikation und retrogradem Tracing die Identifikation von präganglionären CGRP-exprimierenden Neuronen im Rückenmark beschrieben ist. Der Peptidgehalt der Neurone und damit auch die Immunreaktivität wurde durch die Colchicینگabe deutlich gesteigert. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch Colchicin die Ausbildung der Mikrotubuli verhindert wird, somit wird der axonale Transport von Peptiden verhindert und es kommt zu einer Akkumulation der Peptide im Zellkörper (Yamamoto et al. 1989). Die native Darstellung von CGRP in den präganglionären Neuronen des Rückenmarks mittels Immunhistochemie war durch den geringen Peptidgehalt schwierig. Untersuchungen mittels In-Situ-Hybridisierung wären zur genaueren Klärung hilfreich, da die mRNA im Gegensatz zum Peptid nicht über axonalen Transport den Zellkörperbereich verlässt und somit ein nachweisbarer CGRP-mRNA-Gehalt einiger präganglionärer Neurone im Rückenmark zu erwarten wäre.

Bei der morphologischen Betrachtung der Peptid-Expression und Verteilung im SCG zeigte sich ein Vorkommen von AM und AM2/IMD innerhalb der SCG-Neurone, subzellulär war dies am ehesten mit dem eines vesikulär prozessierten Peptids vereinbar. Dieses Verteilungsmuster wird von der aktuellen Literatur für AM bestätigt, die elektronenmikroskopischen Darstellungen sind jedoch aufgrund der Größe der gezeigten Vesikel (ca. 200 nm) nicht unkritisch zu werten, da diese Größe zu groß für Transport- und Speichervesikel ist (Hobara et al. 2004). Eine genauere elektronenmikroskopische Untersuchung mittels Immunogoldmarkierung wäre demnach äußerst interessant.

Die Spezifität des verwendeten AM-Antikörpers wurde mit Hilfe der kond. AM^{-/-}-Maus im zentralen Nervensystem getestet. Hier konnte die Spezifität des von uns verwendeten Antikörpers nicht eindeutig belegt werden. Eine Austestung am SCG der kond. AM^{-/-}-Maus war aufgrund der Eigenschaften des vorliegenden Knockoutstammes nicht möglich, da diese Tiere in den Neuronen des peripheren Nervensystems eine AM-Expression wie ein Wildtyp-Individuum aufweisen. Die Untersuchung von SCG eines globalen AM^{-/-}-Stammes war aufgrund des frühen Versterbens der Tiere während der Fetalentwicklung nicht möglich (Caron und Smithies 2001).

4.3 Wirkung der Peptide der CGRP-Peptidfamilie im SCG

Um den Effekt von AM auf die Funktion der Neurone des SCG zu untersuchen, führten wir Live-Cell-Imaging mit isolierten SCG-Neuronen von tabac-Mäusen durch. Wir entschieden uns bei der Durchführung der Experimente für den tabac-Mausstamm, da wir dadurch in der Lage waren, sicher die SCG-Neurone von anderen Zellen, die ebenfalls im Isolat enthalten waren, zu diskriminieren.

Die isolierten Zellen wurden von uns mit Fura-2 beladen. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzindikator, der in die Zellen aufgenommen wird und Kalzium bindet. Fura-2 kann durch Wellenlängen von 340 nm und 380 nm angeregt werden, und der Quotient des emittierten Lichts beider Wellenlängen ist direkt proportional zur intrazellulären Kalziumkonzentration. Fura-2 ist ein Standardindikator zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Sensitivität reicht von 100 nM bis zu 100 μ M Kalziumkonzentration (Paredes et al. 2008). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Fura-2 durchgeführt.

Wir stimulierten zunächst mit AM und im Anschluss mit Nikotin. Nikotin wirkt als Agonist an nAChR und imitiert somit die Wirkung des Acetylcholins bei der schnellen sympathischen Signalübertragung an der Synapse im SCG (Changeux et al. 1970). Wir postulierten eine mögliche Modulation der Signalübertragung. Die Fähigkeit von AM, aber auch für AM2/IMD, neuronale Signalübertragung zu modulieren, ist für andere Bereiche des Nervensystems bereits beschrieben (Fan et al. 2006; Hosokawa et al. 2010; Li et al. 2013). AM zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Ausprägung der Reaktion auf Nikotin. Ein Grund für das Ausbleiben einer Reaktion bzw. einer Wirkung auf den Kalziumanstieg nach Stimulation könnte konzentrationsbedingt sein, andererseits kann auch die Überexpression des nAChR in den SCG-Neuronen der tabac-Mäuse dazu führen (Frahm et al. 2011), dass diese Antwort nicht modulierbar ist.

Ebenfalls zeigte sich unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen keine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der Zugabe des AM zu Medium. Dies steht im Widerspruch zu anderen Quellen, die an isolierten Eileiterzellen zeigen konnten, dass eine Stimulation des CLR zu einem cAMP-vermittelten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Liao et al. 2013).

Es wäre wichtig, im Weiteren zunächst eine Verdünnungsreihe mit AM durchzuführen und konzentrationsabhängig erneut die nikotinische Antwort zu betrachten. In dieser Arbeit nutzten wir eine Konzentration von 10^{-8} M, welche in anderen Arbeiten aus unserem Labor bereits zu einer Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach ATP-Stimulation in Makrophagen führte (Soultanova 2015). Darüber hinaus wäre eine Wiederholung der Versuche mit AM2/IMD ebenfalls sehr Interessant.

Allerdings besteht eine massive Einschränkung bei der Analyse synaptischer Prozesse an isolierten Zellen per se. Da bei diesen Versuchen die Zell-Zell-Interaktion bewusst zerstört wird, besteht die anatomische Synapse in ihrer eigentlichen Form nicht mehr.

Die Stimulation des Grenzstranges und eine anschließend Wholemout-Kalziummessung mit Hilfe des CLSM wäre sehr interessant, um die Modulation der synaptischen Übertragung im ganzen SCG zu sehen, ohne das die Neurone vereinzelt werden müssen. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe hierzu scheiterten jedoch bislang an den komplexen technischen Voraussetzungen bereits im Anfangsstadium (unpubliziert).

4.4 Regulation der Peptide der CGRP-Peptidfamilie und des CLR-Rezeptorkomplexes unter Hypoxie

Die Expressionssteigerung von AM und AM2/IMD unter Hypoxie wurde bereits vielfach beschrieben (Nagata et al. 1999; Hofbauer et al. 2000; Kocemba et al. 2013; Marinoni et al. 2011; Yang et al. 2005; Yang et al. 2005; Pfeil et al. 2009). Der Fokus der vorhandenen Literatur richtete sich hier jedoch vornehmlich auf Angiogenese bei Tumorerkrankungen (Nakayama et al. 1998) und auf die vasodilatatorischen Eigenschaften von AM und AM2/IMD (Hofbauer et al. 2000) sowie auf die Veränderungen der Gefäßpermeabilität (Pfeil et al. 2009; Nikitenko et al. 2003; Nagata et al. 1999; Aslam et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir erstmals einen quantitativen Überblick mittels quantitativer Real-time RT-PCR über den Effekt von Hypoxie auf AM- und AM2/IMD-mRNA-Expression in verschiedenen Organen der Maus geben. Die Analyse nach einer eintägigen Exposition der Mäuse mit 10% O₂ zeigte, dass es zu einer hypoxischen Expressionssteigerung von AM und AM2/IMD kam. Eine solche Regulation unter Hypoxie wurde oftmals als direkter Effekt von HIF erklärt (Kocemba et al. 2013; Bell & McDermott 2008). Das AM-Gen hat hierfür drei HIF-1-bindende Promotorregionen, welche bei Hypoxie eine Expressionssteigerung von AM bewirken können (Garayoa et al. 2000). Dieser Mechanismus wurde bereits als ein wichtiger Faktor in der Rolle von AM als proangiogenetischer Faktor solider Tumore angesehen (Zudaire et al. 2003).

In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es unter den hier gewählten Bedingungen der Haltung der Mäuse in normobarer Hypoxie nicht zu einer generellen Steigerung der Expression von AM oder AM2/IMD kommt, sondern eine signifikante Expressionssteigerung der AM-mRNA nur in der Lunge und im rechten Ventrikel des Herzens nachzuweisen war, für AM2/IMD ausschließlich im SCG. Dies wäre dadurch zu erklären, dass es möglicherweise nicht zu einer generellen Sauerstoffunterversorgung der verschiedenen Gewebe kam. Hinweis hierfür ist, dass es unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu einer starken Expressionssteigerung von TrkB und Endothelin 1 in der Lunge, nicht aber im SCG kam. Für TrkB und Endothelin 1 ist bekannt, dass es zu einer Expressionssteigerung unter Hypoxie kommt (Kwapiszewska et al. 2012; Ambrosini et al. 2015). Dafür spricht weiter die Tatsache, dass die hier verwendete normobare Hypoxie mit 10% O₂ relativ mild ist. In der Literatur wurden häufiger Sauerstoffkonzentrationen von 6-8% O₂ verwendet (Bernaudin et al. 2002; Stroka et al. 2001; Wiesener et al. 2003). Jedoch gibt es ebenso Arbeiten, bei denen ebenfalls eine O₂-Konzentration von 10% verwendet wurde (Waskova-Arnostova et al. 2014).

In der Literatur ist allerdings keine Arbeit zu finden, welche einen Vergleich verschiedener O₂-Konzentrationen im Rahmen der experimentellen Hypoxie miteinander anstellt. Es wäre

aufgrund dieser Ergebnisse interessant, eine Analyse der HIF-1 α -Stabilisierung unter den verwendeten Bedingungen in den verschiedenen Geweben durchzuführen.

In der Lunge kam es zu einer deutlichen Hochregulation von AM nach einem Tag in Hypoxie (10% O₂). Diese Expressionssteigerung von AM wurde bereits beschrieben und scheint einen protektiven Einfluss auf das vaskuläre Remodelling der Lungengefäße unter chronischer Hypoxie zu haben (Matsui et al. 2004). Diese Experimente sind zwar ebenfalls mit 10% durchgeführt worden, allerdings wurde hier eine längere Hypoxiezeit, zwischen 3 und 21 Tagen, untersucht. Im SCG und im CSMG zeigte sich im ersten Screening eine nicht signifikante Steigerung der AM-mRNA-Expression, für AM2/IMD konnte im SCG bereits eine signifikante Expressionssteigerung gezeigt werden. Die in den ersten Screeningversuchen gewählte n-Zahl von vier ist für eine reliable Aussage sehr gering und diente insbesondere der Auswahl der nachfolgend ausführlicher untersuchten Organe. Da der Fokus in dieser Arbeit auf der Analyse der Expression von AM und AM2/IMD in sympathischen paravertebralen Ganglien lag, wurden keine weiteren Analysen des CSMG durchgeführt.

Die Frage, die aus diesen Ergebnissen resultierte, ist, ob die Regulation von AM und AM2/IMD im sympathischen Nervensystem unter normobarer Hypoxie eventuell eine Rolle bei der mittelfristigen Kreislaufadaptation durch Modulation des sympathischen Nervensystems spielen könnte. Solche Beobachtungen wurden auf zerebraler Ebene im Nucleus tractus solitarii der Ratte beschrieben (Li et al. 2013). Kreislaufregulatorische Effekte von AM und AM2/IMD auf vaskulärer Ebene sind ebenfalls bereits vielfach in der Literatur beschrieben (Eguchi et al. 1994; Takei et al. 2004; Kitamura et al. 1993; Bell & McDermott 2008; Pan et al. 2005).

Eine Beschreibung von AM oder AM2/IMD in der Verbindung zwischen zentralem Nervensystem und Gefäßsystem – den sympathischen Neuronen - ist jedoch nicht in der Literatur zu finden. Dies war der Grund, die Expression der CGRP-Peptidfamilie – im speziellen AM und AM2/IMD - sowie des CLR-Rezeptorkomplexes in sympathischen Ganglien näher zu untersuchen.

Die Analyse der murinen SCG mittels quantitativer Real-time RT-PCR nach Exposition mit normobarer Hypoxie zeigte in dieser Arbeit, dass es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der mRNA von AM, AM2/IMD sowie von RAMP1 und 2 kam. Dieser Anstieg, vor allen Dingen von AM um den Faktor 8,2, ist bei der relativ hohen Basalexpression als starke Expressionsteigerung zu werten. Es kam passend zu der Expressionsteigerung von AM und AM2/IMD zu einer Hochregulation der mRNA-Expression von RAMP1 und RAMP2. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer Sensitivierung des CLR im Bezug auf die Rezeptorwirkung als AM- und AM2/IMD-Rezeptor kommt. Die mRNA-Expression von CGRP war nicht erhöht. Die hier durchgeführte Expressionsanalyse beschränkte sich jedoch auf eine Analyse der mRNA. Dabei lässt man außer Acht, dass es zu postrationalen

Modifikationen kommen kann. Die Literatur beschreibt eine solche Modifikation in Abhängigkeit von HIF bei der AM-Expression (Sena et al. 2014). Um dies zu überprüfen, wäre es sinnvoll, eine Analyse der verschiedenen Organe unter den gleichen Bedingungen auf den Proteingehalt hin durchzuführen. Dies wäre aufgrund der geringen Größe der Peptide am sinnvollsten mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Radioimmunoassay der Fraktionen zu erreichen. Bisherige Versuche mittels derzeit verfügbarer Antikörper zeigten in der Arbeitsgruppe jedoch keine verlässlichen Ergebnisse (unpubliziert).

4.5 Der präganglionäre Einfluss auf die Expression von AM und AM2/IMD im SCG

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer mRNA-Expressionssteigerung von AM, AM2/IMD RAMP1 und RAMP2 im SCG von Mäusen nach 24-stündigem Aufenthalt in einer Umgebung mit 10% O₂ kommt. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen ergaben sich drei möglich Auslöser für die Expressionssteigerung.

1. *Die verringerte Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft führt zu einer lokalen Hypoxie im SCG und somit zu einem Anstieg von HIF, was zu einer Expressionssteigerung führt.*

Diese Möglichkeit wurde bereits angerissen. Für diese Möglichkeit spricht, dass eine Regulation von AM durch HIF bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Garayoa et al. 2000). Auch für das AM2/IMD-Gen wurde beschrieben, dass es vier verschiedene Promoter-Regionen enthält - sogenannte hypoxia responsive elements – über die unter Hypoxie durch Einfluss von HIF die mRNA-Expression des nachgeschalteten Gens gesteigert wird, und dass Hypoxie die AM2/IMD Expression steigert (Pfeil et al. 2009).

Eine Hypoxie-induzierte Steigerung der Expression von RAMP1 und 3 ohne eine Steigerung der Expression von RAMP2 wurde in der Lunge der Ratte bereits beschrieben. Dort wird die Steigerung der mRNA-Expression auf eine direkte Aktivierung durch HIF zurückgeführt (Qing et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass es nach eintägigem Aufenthalt in einer Umgebung mit 10% O₂ nicht zu einer generellen Steigerung der Expression von AM und AM2 kam. Wie bereits erwähnt, könnte dies dadurch zustande gekommen sein, dass durch suffiziente Kompensationsmechanismen die O₂-Versorgung des neuronalen Gewebes bei den gewählten Versuchsbedingungen aufrechterhalten wurde. Ergänzend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zwar zu einem Anstieg der mRNA-Expression von Endothelin 1 und TrkB in der Lunge kam, nicht jedoch im SCG. Endothelin 1 und TrkB werden in hypoxischen Geweben durch HIF vermittelt heraufreguliert (Davie et al. 2009; Kwapiszewska et al. 2012).

Somit ist in Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der vorhandenen Literatur diese Annahme eher als unwahrscheinlich zu sehen. Jedoch wäre für eine absolute Sicherheit ein direkter HIF-Nachweis im SCG unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen notwendig.

2. *Die verringerte Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft führt zu einem gesenkten arteriellen pO₂ und damit zu einer Aktivierung von peripheren*

Chemorezeptoren, wie dem Glomus caroticum, was zu einer Aktivierung sympathischer, kardiovaskulärer Zentren im Hirnstamm führt und somit eine erhöhte präganglionäre Aktivität in kardial und vaskulär projizierenden sympathischen Bahnen bedingt.

Dieser Mechanismus könnte innerhalb des sympathischen Ganglions sowohl durch eine Aktivierung des CLR mittels CGRP erfolgen als auch über eine cholinerge Aktivierung nikotinischer Rezeptoren sowie des muskarinischen M1-Rezeptors (Briggs 1992; Fink et al. 1988). Eine Einschätzung der Rolle der cholinergen Aktivierung konnte uns die Analyse der Basalexpression der CGRP-Peptid-Familie und des CLR-Rezeptorkomplexes im Vergleich von drei Mausstämmen liefern, zum einen in Bl6-Mäusen als Referenz, zum anderen in M1^{-/-}-Mäusen, die keinen funktionsfähigen muskarinischen Rezeptor Typ 1 exprimieren (Fisahn et al. 2002) und somit eine reduzierte metabotrope, cholinerge Transmission im SCG aufweisen. Als dritte Gruppe wurden tabac-Mäuse untersucht, die eine Überexpression der Beta-4-Untereinheit des nikotinischen Rezeptors (Frahm et al. 2011) und somit potenziell eine erhöhte ionotrope cholinerge synaptische Transmission im SCG aufweisen, da nikotinische Rezeptoren mit der Untereinheitszusammensetzung $\alpha 3\beta 4$ für die schnelle Übertragung im sympathischen Ganglion der Maus verantwortlich sind (Mao et al. 2006). Dieser Vergleich wurde in dieser Art in der Literatur bislang nicht beschrieben. In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich kein Unterschied der basalen mRNA-Expression der CGRP-Peptidfamilie im SCG. Einen Unterschied zwischen diesen Tieren nach Hypoxieexposition zu untersuchen, erscheint interessant und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

In dieser Arbeit wurden Versuche unternommen, die ex-vivo und somit ohne weiteren Tierversuch auskamen. Wir stellten die angenommene erhöhte synaptische Transmission im SCG unter Hypoxiebedingungen nach, indem wir den präganglionären Einfluss durch EFS nachahmten. Dieser Versuch zeigte keinen Anstieg der mRNA-Level für AM oder AM2/IMD. Um nun zum einen die Ergebnisse durch eine weitere Methode zu unterstützen und zum anderen die Möglichkeit einer CGRP-induzierten Regulation nachzustellen, wurde von uns eine Inkubation der isolierten SCG mit CGRP, Nikotin und Muskarin durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von AM vor und nach Stimulation. Die Daten dieser Arbeit legen somit nahe, dass der präganglionäre Einfluss, sei er cholinerg oder durch CGRP-Ausschüttung bedingt, nicht für die Expressionssteigerung von AM und AM2/IMD unter Hypoxie verantwortlich zu sein scheint.

3. Die verringerte Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft führt zu einer Ausschüttung systemisch zirkulierender Faktoren, die eine Expressionssteigerung im SCG bedingen.

Die von uns gezeigten Ergebnisse zeigten keinen Hinweis auf eine Induktion der Expressionssteigerung von AM und AM2/IMD im SCG nach Hypoxieexposition durch gesteigerten präganglionären Input. Diese Tatsache legt die Möglichkeit nahe, dass es im Rahmen der Hypoxie zu einer Ausschüttung zirkulierender Faktoren kommt, die eine Expressionssteigerung von AM und AM2/IMD im SCG bedingen. Die möglichen Mediatoren, welche durch Hypoxie im Serum vermehrt auftreten und möglicherweise eine Steigerung der Expression von AM und AM2/IMD bedingen könnten, sind sehr zahlreich.

So kommt es zum Beispiel in der Ratte bei einer 24-stündigen Hypoxie zu einem Anstieg des Parathormonspiegels (Mimura 1995), welcher wiederum einen Einfluss auf die cAMP-Bildung hat und somit potenziell Veränderungen in der mRNA-Expression von SCG-Neuronen bewirken könnte (Kamel & Yee 2013). Des Weiteren kommt es unter Hypoxie zur starken Ausschüttung von Mediatoren, wie beispielsweise „Early-growth-response gene product 1“ (EGR-1), Hitzeschockprotein-27, -70 und Caspasen-gespaltenes Cytokeratin-18. Diese können ihrerseits wiederum zur Expressionssteigerung von angiogenetischen Faktoren führen. Diese Faktoren könnten auch eine Änderung im Expressionsmuster der SCG-Neurone bewirken (Yan et al. 1998; Lichtenauer et al. 2014).

Allerdings sind diese Überlegungen rein hypothetischer Natur, in dieser Arbeit wurden hierzu keine Messungen durchgeführt. Eine systematische Suche nach möglichen Mediatoren, die zu einer selektiven Expressionsteigerung der mRNA von AM und AM2/IMD im SCG führen, wäre interessant und wichtig, um die Ursache der Expressionsteigerung unter den von uns gezeigten Bedingungen zu klären.

4.6 Schlussfolgerung

- *Identifikation der genauen Lokalisation und des Vorkommens von AM, AM2/IMD und CGRP im SCG der Maus*

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen, dass Neurone im SCG AM, AM2/IMD sowie den CLR mit allen drei RAMPS exprimieren. CGRP kommt im SCG als Peptid, vor allem in Nervenfasern vor. Die CGRP enthaltenden Nervenfasern sind sowohl präganglionären als auch sensiblen Ursprungs.

- *Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen unter Hypoxie*

Es kommt zu einer hypoxischen Expressionssteigerung von AM, AM2/IMD im SCG und passend dazu zu einer Steigerung der Expression von RAMP1 und 2. Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass die ursprünglich postulierte gesteigerte präganglionäre Aktivierung nicht die Ursache für die Expressionssteigerung ist.

- *Klärung der Wirkung von Adrenomedullin auf sympathische Neurone des murinen SCG.*

Untere den von uns gewählten Versuchsbedingungen hatte AM keine Wirkung auf die Reaktion der SCG-Neurone auf eine Stimulation durch Nikotin. Darüber hinaus konnte auch keine Veränderung des Membranpotenzials durch AM alleine gezeigt werden.

5 Zusammenfassung

Ein Vorkommen von Peptiden der Calcitonin-Peptidfamilie ist in fast allen Organen des Körpers in verschiedenen Spezies beschrieben. Vor allem CGRP und AM sowie AM2/IMD sind bekannt für Ihre neuromodulatorischen Eigenschaften. Ein Einfluss auf zentrale sympathische Zentren wurde für AM und AM2/IMD sowie für CGRP bereits beschrieben. In dieser Arbeit wurden die Expression und Regulation des AM-Signalwegs in sympathischen paravertebralen Ganglien der Maus untersucht.

Es wurden männliche C57Bl6/N Mäuse unter Standardbedingungen sowie nach eintägiger Exposition mit 10% normobarer Hypoxie untersucht. Das Vorkommen und die Quantifizierung von CGRP, AM, AM2/IMD sowie des gesamten CLR-Rezeptorkomplexes wurden mittels Immunhistochemie und quantitativer real-time RT-PCR (qPCR) bestimmt. Mechanismen der Expressionsteigerung wurden in Ex Vivo-Stimulationsversuchen in explantierten Ganglien nach elektrischer Feldstimulation und pharmakologischer Stimulation untersucht. Der Einfluss von AM auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde an isolierten postganglionären sympathischen Neuronen des SCG gemessen.

Diese Arbeit zeigte anhand qPCR und Immunhistochemie eine Expression von AM und AM2/IMD in sympathischen paravertebralen Ganglien der Maus. CGRP fand sich in sensorischen Nervenfasern und in präganglionären Axonen aus dem Rückenmark. Im initialen Organscreening zeigte sich nach Hypoxie in der qPCR ein signifikanter Anstieg von AM im rechten Ventrikel des Herzens und in der Lunge sowie von AM2/IMD im SCG. Eine weiter gehende Analyse des SCG zeigte nach eintägiger Hypoxieexposition einen signifikanten Anstieg der mRNA-Konzentration von AM, AM2/IMD, RAMP1 und RAMP2. Hierfür ist keine generelle Hypoxie verantwortlich, da Marker direkter Gewebhypoxie (TrkB und Endothelin1) zwar in der Lunge, nicht aber im SCG anstiegen. Sowohl eine pharmakologische Stimulation mit CGRP, Muskarin oder Nikotin als auch eine elektrische Feldstimulation bewirkten keine Expressionsteigerung von AM in isolierten Ganglien. In Life-Cell-Imaging-Experimenten führte AM unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht zu Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration isolierter SCG Neurone und hatte keinen Einfluss auf den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Nikotingabe.

Die Ergebnisse zeigen erstmals die Expression des vollständigen AM(2)-Signalwegs in sympathischen paravertebralen Ganglien sowie dessen Regulation unter Hypoxieexposition, deren Mechanismen noch weiterer Abklärung bedürfen.

6 Abstract

The occurrence of peptides of the calcitonin-peptide family is described in more or less every organ in different species. Especially for CGRP, AM and AM2/IMD, neuromodulatory properties are known. An influence on central sympathetic centres is described for AM and AM2/IMD as well as for CGRP. The present work addressed expression and regulation of the AM-signalling pathway in sympathetic paravertebral ganglia of the mouse.

Male C57Bl6/N mice were investigated under standard conditions and after exposure to 10% normobaric hypoxia. Occurrence and quantification of CGRP, AM, AM2/IMD as well as of the whole CLR receptor complex were analysed by immunohistochemistry and quantitative real-time RT-PCR (qPCR). Mechanisms of increase in mRNA-expression were analysed by ex-vivo stimulation of explanted ganglia either by electric field stimulation or by pharmacological stimulation. The influence of AM upon intracellular calcium concentration was measured in isolated postganglionic sympathetic neurons of the SCG.

This work demonstrated expression of AM and AM2/IMD in sympathetic paravertebral ganglia of the mouse by immunohistochemistry and qPCR. CGRP was present in sensory nerve fibres and in preganglionic fibres origin from the spinal cord. An initial qPCR organ screening after hypoxic exposure showed a significant increase in AM-mRNA expression in the right cardiac ventricle and in the lung. For AM2/IMD, enhanced mRNA-expression was measured in the SCG. Further analysis of the SCG after exposure to hypoxia for one day revealed significantly increased mRNA-levels of AM, AM2/IMD, RAMP1 und RAMP2. For this effect, general hypoxia is not responsible, because markers of hypoxic tissue (TrkB and endothelin1) were elevated only in the lung but not in the SCG. Neither pharmacological stimulation with CGRP, muscarine and nicotine nor electric field stimulation increased AM-mRNA-expression in isolated ganglia. In life-cell-imaging, AM had no effect upon intracellular calcium concentration in isolated SCG neurons. Further, it had no effect on the increase in intracellular calcium concentration evoked by nicotinic stimulation.

This work is the first to describe the expression of the entire AM(2)-signalling pathway in sympathetic paravertebral ganglia and its regulation under conditions of hypoxic exposure. The underlying mechanisms of hypoxic regulation need further investigation.

7 Abkürzungsverzeichnis

AM	Adrenomedullin
AM ^{-/-}	Adrenomedullin Knockout
AM2	Adrenomedullin 2
AM2/IMD	Adrenomedullin2/Intermedin
BI6	C57BI6/N
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CLR	Calcitonin receptor-like receptor
CLR ^{-/-}	Calcitonin receptor-like receptor Knockout
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CSMG	Ganglion coeliacum/mesentericum superius
CT	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	Elektrische Feldstimulation
EGR-1	Early-growth-response gene 1
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
Ggl.	Ganglion
GH	Growth Hormon
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IMD	Intermedin
KCl	Kaliumchlorid
KO	Knockout
kond. AM ^{-/-}	Konditionale Adrenomedullin Knockoutmaus
M1 ^{-/-}	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor 1 Knockout
ChAT	Cholinacetyltransferase
mAChR	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MEM	Minimal essential Medium
MG	β2 Mikroglobulin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N.	Nervus

Abkürzungsverzeichnis

nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PAMP	Proadrenomedullin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RAMP	Receptor associated modifying Protein
RAMP2 ^{-/-}	Receptor associated modifying protein 2 Knockout
RCP	Receptor associated protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SCG	Ganglion cervicale superius
SP	Substanz P
tabac	transgenic a3b4a5 cluster
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
VACht	Vesikulärer Acetylcholintransporter
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des CLR und der RAMPS (nach inhaltlichen Angaben in: Evans et al. 2000; McLatchie et al. 1998; Njuki et al. 1993 & Flühmann et al. 1995) _____ 12

Abbildung 2. Beispiel für Rohdaten der quantitativen PCR und von Schmelzkurven _____ 33

Abbildung 5. Real-time RT-PCR; Übersicht über die relative mRNA-Expression von AM in verschiedenen Organen. Jeder Messwert ist als farbiger Punkt dargestellt.
CSMG=Ggl. coeliaco-mesentericum superius _____ 40

Abbildung 6. Real-time RT-PCR; Übersicht über die relative mRNA Expression von AM2/IMD in verschiedenen Organen. Jeder Messwert ist als farbiger Punkt dargestellt. _____ 42

Abbildung 7. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Abschnitten des Herzens. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede sind bei $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) mit * markiert. _____ 44

Abbildung 8. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt, statistisch signifikante Unterschiede sind bei $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) mit * markiert. _____ 45

Abbildung 9. Real-time RT-PCR; AM-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Ganglien. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test) _____ 46

Abbildung 10. Real-time RT-PCR; AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Abschnitten des Herzens. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test) _____ 47

Abbildung 11. Real-time RT-PCR; AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen

Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test) _____ 48

Abbildung 12 AM2/IMD-mRNA nach eintägiger normobarer Hypoxie und in einer normoxischen Vergleichsgruppe in verschiedenen Organen. Die einzelnen Messwerte sind hier als farbige Punkte einzeln dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert. _____ 49

Abbildung 13. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression der CGRP-Peptidfamilie im SCG nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * und hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$, Mann-Whitney-Test) mit ** markiert. _____ 50

Abbildung 14. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression des CLR und der drei RAMPs im SCG nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert. _____ 51

Abbildung 15. Immunhistochemie mit Antikörpern gegen die Peptide AM (a) AM2/IMD (b) CGRP (c) und den CLR (d), SCG der Maus. _____ 52

Abbildung 16. Immunhistochemische Charakterisierung der CGRP-positiven Nervenfasern im SCG mit Antikörpern gegen SP, gegen den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) und mit dem nukleären Marker DAPI. Die drei Spalten zeigen aufsteigende Vergrößerungen (a,b,c). In den ersten drei Spalten sind jeweils die Aufnahmen mit den verschiedenen Filtern für die verschiedenen Markierungen zu sehen. In der letzten Spalte ist ein Überlagerungsbild aller drei Immunmarkierungen plus DAPI zu sehen. Die Pfeile mit Kugel zeigen auf eine SP- und CGRP-positive Nervenfaser, Die Pfeile mit Raute auf eine cholinerge CGRP positive-Nervenfaser. _____ 53

Abbildung 17. Immunhistochemie am Ganzpräparat eines sympathischen Halsgrenzstrangs einer ChAT-eGFP-Maus nach Nervenquetschung. In den verschiedenen Zeilen sind aufsteigende Vergrößerungen (a,b,c) gezeigt. In der ersten Reihen ist die Antikörpermarkierung gegen CGRP gezeigt, in der zweiten Spalte eGFP-Fluoreszenz. In der dritten Spalte sieht man die Überlagerung beider Signale. Der Pfeil zeigt auf eine doppelt positive Nervenfaser. _____ 54

Abbildung 18. a) Rückenmark mit CGRP-Immunreaktion, Epifluoreszenzmikroskopie, HH markiert das Hinterhorn, VH das Vorderhorn, der Pfeil zeigt auf Zellen des Seitenhorns. In b) ist ein Seitenhornneuron einer ChAT-eGFP-Maus mit Hilfe des CLSM dargestellt und dreidimensional rekonstruiert. In gelb ist die Antikörpermarkierung des CGRP zu sehen, in grün das eGFP-Signal. _____ 55

Abbildung 19. Real-time RT-PCR; relative mRNA-Expression von TrkB und Endothelin 1 nach eintägiger Hypoxie und nach Normoxie. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) sind mit * markiert. _____ 56

Abbildung 20. Real-time RT-PCR; Basalexpression der mRNA der Mitglieder der CGRP-Peptidfamilie, im SCG von Bl6-, M1^{-/-}- und tabac-Mäusen. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Messwerte angezeigt. Ein Boxplot ist überlagert. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test). ____ 57

Abbildung 21. Real-time RT-PCR; Basalexpression der mRNA des des CLR und der drei RAMPs in SCG von Bl6-, M1^{-/-}- und tabac-Mäusen. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Werte angezeigt. Ein Boxplot ist überlagert. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test). ____ 58

Abbildung 24. Real-time RT-PCR; rel. mRNA-Expression von AM nach pharmakologischer Stimulation von explantierten SCG. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte, zusätzlich sind Quartile dargestellt, der kräftige Strich zeigt den Median, die beiden dünneren Striche das obere und untere Quartil. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test). _____ 61

Abbildung 26. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Isolierte Zellen des SCG einer tabac-Maus. In a Darstellung des GFP-Signals, in b Darstellung des Signals von Fura-2, mit dem eingezeichneten Messbereich der Fluoreszenz („region of interest“ (ROI)). Der Pfeil mit Raute zeigt auf ein Neuron, der normale Pfeil auf eine nicht-neuronale Zelle. _____ 64

Abbildung 27. Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zu sehen ist die gemessene Ratio der Fura-2-Fluoreszenz bei Anregung mit 340 bzw. 380 nm. In rot ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der Zellen dargestellt, zu deren Medium initial AM in einer Konzentration von 10^{-8} M gegeben wurde (46 Zellen aus 6 Versuchen; $n=46/6$), in blau Mittelwert \pm Standardabweichung der Kontrolle nach Zugabe von Medium ($n=45/6$). Die

Konzentration des Nikotins war 10^{-4} M, KCl wurde in einer Konzentration von 10^{-3} M gegeben. _____ 64

Abbildung 28. Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Nikotingabe. Als farbig gefüllte Kreise sind die jeweiligen Werte angezeigt Ein Boxplot ist überlagert. Der Kontroll-Gruppe wurde Medium anstelle von AM (10^{-8} M) 240 Sekunden vor der Nikotinstimulation zugegeben. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$, Mann-Whitney-Test). Analysiert wurden $n=45/6$ und $46/6$, d.h. 45 bzw. 46 Zellen aus 6 verschiedenen Versuchen. _____ 65

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Chemikalien/Reagenzien	16
Tabelle 2. Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 3. Geräte	17
Tabelle 4. Gebrauchslösungen	18
Tabelle 5. PCR-Materialien	19
Tabelle 6. Primärantikörper	20
Tabelle 7. Sekundärantikörper/-reagenzien; Ig = Immunglobulin	21
Tabelle 8. Software	21
Tabelle 9. Zellkulturmaterialien	22
Tabelle 10. Pharmaka	22
Tabelle 11. Sonstige Lösungen	23
Tabelle 12. Antikörperkombinationen bei der Dreifachmarkierung	27
Tabelle 13. Primer	31

10 Literaturverzeichnis

- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 1982, 298(5871), pp.240–244.
- Ambrosini S, Sarchielli E, Comeglio P, Porfirio B, Gallina O, Morelli A, Vanelli GB. Fibroblast growth factor and endothelin-1 receptors mediate the response of human striatal precursor cells to hypoxia. *Neuroscience*, 2015, 19 (289), pp.123–33.
- Aslam M, Gündüz D, Schuler D, Li L, Sharifpanah F, Sedding D, Piper HM, Noll T. Intermedin induces loss of coronary microvascular endothelial barrier via derangement of actin cytoskeleton: role of RhoA and Rac1. *Cardiovascular research*, 2011, 92(2), pp.276–86.
- Bell D, McDermott BJ. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacological reviews*, 1996, 48(2), pp.253–88.
- Bell D, McDermott BJ. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *British journal of pharmacology*, 2008, 153, pp.S247–62.
- Bernaudo M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 2002, 22(4), pp.393–403.
- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *British journal of pharmacology*, 1985, 86(4), pp.855–60.
- Briggs CA. Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic ganglion: effects of cyclic GMP and nitric oxide generators. *Brain Research*, 1992, 573(1), pp.139–146.
- Caron KM, Smithies O. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(2), pp.615–9.
- De Castro F. Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. *Trauvaeux du Laboratoire de Recherches Biologique de l'Université de Madrid*, 1927, 25, pp.331–380.
- Chang LC, Roh J, Park JI, Klein C, Cushman N, Haberberger RV, Hsu SYT. Intermedin functions as a pituitary paracrine factor regulating prolactin release. *Molecular endocrinology* 2005, 19(11), pp.2824–38.
- Changeux JP, Kasai M, Lee CY. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic

- receptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970, 67(3), pp.1241–7.
- Chapman EM, Kinsey D. Sympathetic innervation of the heart in man; preliminary observations of the effect of thoracic sympathectomy on heart rate. *Journal of the American Medical Association*, 1948, 137(7), pp.579–84.
- Chun TH, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Korenga R, Ando J, Nakao K. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *Hypertension*, 1997, 29(6), pp.1296–302.
- Coleridge HM, Coleridge JCG, Howe A. Thoracic Chemoreceptors in the Dog: A Histological and Electrophysiological Study of the Location, Innervation and Blood Supply of the Aortic Bodies. *Circulation Research*, 1970, 26(2), pp.235–247.
- Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(23), pp.8628–32.
- Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC. Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(28), pp.17787–92.
- Dackor RT, Fritz-Six K, Dunworth WP, Gibbons C, Smithies O, Caron KM. Hydrops fetalis, cardiovascular defects, and embryonic lethality in mice lacking the calcitonin receptor-like receptor gene. *Molecular and cellular biology*, 2006, 26(7), pp.2511–8.
- Dale H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1914, pp.147–190.
- Davie NJ, Schermuly RT, Weissmann N, Grimminger F, Ghofrani HA. The science of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future studies. *European journal of clinical investigation*, 2009, 39 Suppl. 2, pp.38–49.
- Dong F, Taylor MM, Samson WK, Ren J. Intermedin (adrenomedullin-2) enhances cardiac contractile function via a protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathway in murine ventricular myocytes. *Journal of applied physiology* 2006, 101(3), pp.778–84.
- Dzielińska Z, Małek LA, Januszewicz A, Prejbisz A, Pręgowski J, Tyczyński P, Makowiecka-Cieśla M, Janas J, Demkow M, Rużyło W. Adrenomedullin concentrations at two time points following myocardial infarction and prediction of mid-term outcomes. *Archives of medical science*, 2011, 7(6), pp.971–6.
- Eguchi S, Hirata Y, Iwasaki H, Sato K, Watanabe TX, Inui T, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F. Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 1994, 135(6), pp.2454–8.
- Elfvin LG, Lindh B, Hökfelt T. The chemical neuroanatomy of sympathetic ganglia. *Annual review of neuroscience*, 1993, 16, pp.471–507.
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM. CGRP-RCP, a novel protein

- required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. 2000, *The Journal of biological chemistry*, 275(40), pp.31438–43.
- Fan MX, Li X, Wang J, Cao YX, Shen LL, Zhu DN. Effect of adrenomedullin on the activity of barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*, 2006, 58(3), pp.193–200.
- Feldberg W, Gaddum JH. The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *The Journal of physiology*, 1934, 81(3), pp.305–19.
- Fernández AP, Serrano J, Tessarollo L, Cuttitta F, Martínez A. Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(34), pp.12581–6.
- Fink JS, Verhave M, Kasper S, Tsukada T, Mandel G, Goodman RH. The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(18), pp.6662–6.
- Finley JCW, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Research*, 1992, 572(1-2), pp.108–116.
- Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, McBain CJ, Wess J. Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron*, 2002, 33(4), pp.615–24.
- Fisher LA, Kikkawa DO, Rivier JE, Amara SG, Evans RM, Rosenfeld MG, Vale WW, Brown MR. Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature*, 1983, 305(5934), pp.534–6.
- Flühmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, Born W. A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochemical and biophysical research communications*, 1995, 206(1), pp.341–7.
- Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, Auer S, Filkin S, Pons S, Fontaine JF, Tsetlin V, Maskos U, Ibañez-Tallón I. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*, 2011, 70(3), pp.522–35.
- Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Takei Y, Miura K, Shoukouji T, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y. Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats. *European journal of pharmacology*, 2004, 497(1), pp.75–80.
- Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pío R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Molecular endocrinology*, 2000, 14(6), pp.848–62.
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiological reviews*, 1994, 74(4), pp.829–98.

- Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *The EMBO journal*, 2012, 31(11), pp.2448–60.
- Gulbenkian S, Merighi A, Wharton J, Varndell IM, Polak JM. Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig. *Journal of neurocytology*, 1986,15(4), pp.535–42.
- Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Baraban SC, Stornetta RL, Li YW. Role of medulla oblongata in generation of sympathetic and vagal outflows. *Progress in brain research*, 1996, 107, pp.127–44.
- Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell and tissue research*, 2002, 310(1), pp.41–50.
- Heym C, Liu N, Gleich A, Oberst P, Kummer W. Immunohistochemical evidence for different pathways immunoreactive to substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the guinea-pig stellate ganglion. *Cell and tissue research*, 1993, 272(3), pp.563–74.
- Heym C, Common B, Klimaschewski L, Preissler U, Kummer W. Immunohistochemical evidence from co-localization and denervation studies for four types of substance P-containing nervous structures in the rat superior cervical ganglion. *Anatomy and embryology*, 1993, 187(5), pp.485–92.
- Hippenstiel S, Witzernath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krüll M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schütte H, Suttrop N. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circulation research*, 2002, 91(7), pp.618–25.
- Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM; MK-0974 Protocol 004 study group. Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology*, 2008, 70(16), pp.1304–12.
- Hobara N, Nakamura A, Ohtsuka A, Narasaki M, Shibata K, Gomoita Y, Kawasaki H. Distribution of adrenomedullin-containing perivascular nerves in the rat mesenteric artery. *Peptides*, 2004, 25(4), pp.589–99.
- Hofbauer KH, Jensen BL, Kurtz A, Sandner P. Tissue hypoxxygenation activates the adrenomedullin system in vivo. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2000, 278(2), pp.R513–9.
- Höppener JW, Steenbergh PH, Zandberg J, Bakker E, Pearson PL, Geurts van Kessel AH, Jansz HS, Lips CJ. Localization of the polymorphic human calcitonin gene on chromosome 11. *Human genetics*, 1984, 66(4), pp.309–12.
- Hosokawa S, Endoh T, Shibukawa Y, Tsumura M, Ichikawa H, Tazaki M, Furusawa M. Calcitonin gene-related peptide- and adrenomedullin-induced facilitation of calcium current by different signal pathways in nucleus tractus solitarius. *Brain research*, 2010,1327, pp.47–55.
- Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW, Bee MS. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(Pt 1):29-34

- Hurtado O, Serrano J, Sobrado M, Fernández AP, Lizasoain I, Martínez-Murillo R, Moro MA, Martínez A. Lack of adrenomedullin, but not complement factor H, results in larger infarct size and more extensive brain damage in a focal ischemia model. *Neuroscience*, 2010, 171(3), pp.885–92.
- Hwang IS, Fung ML, Liong EC, Tipoe GL, Tang F. Age-related changes in adrenomedullin expression and hypoxia-inducible factor-1 activity in the rat lung and their responses to hypoxia. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 2007, 62(1), pp.41–9.
- Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *The Journal of clinical investigation*, 2008, 118(1), pp.29–39.
- Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Letters*, 1994 338(1), pp.6–10.
- Isaksson B, Wang F, Permert J, Olsson M, Fruin B, Herrington MK, Enochsson L, Erlanson-Albertsson C, Arnell U. Chronically administered islet amyloid polypeptide in rats serves as an adiposity inhibitor and regulates energy homeostasis. *Pancreatology*, 2005, 5(1), pp.29–36.
- Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 1994, 203(1), pp.631–9.
- Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 1998, 139(3), pp.838–46.
- Jänig W, McLachlan EM. Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system. *Trends in neurosciences*, 1992, 15(12), pp.475–81.
- Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation*, 1995, 92(3), pp.286–9.
- Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr. *Diabetes*, 1990, 39(5), pp.634–8.
- Kakishita M, Nishikimi T, Okano Y, Satoh T, Kyotani S, Nagaya N, Fukushima K, Nakanishi N, Takishita S, Miyata A, Kangawa K, Matsuo H, Kunieda T. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clinical science* 1999, 96(1), pp.33–9.
- Kamel SA, Yee JA. Continuous and intermittent exposure of neonatal rat calvarial cells to PTHrP (1-36) inhibits bone nodule mineralization in vitro by downregulating bone sialoprotein expression via the cAMP signaling pathway. *F1000Research*, 2013, 2, p.77.
- Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, Nagaya N, Noguchi T, Yamada N, Morii I, Kawamura A, Doi K, Miyatake K, Tomoike H, Kangawa K. The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *Journal of*

- cardiovascular pharmacology*, 2010, 56(4), pp.413–9.
- Kim SM, Kim JY, Lee S, Park JH. Adrenomedullin protects against hypoxia/reoxygenation-induced cell death by suppression of reactive oxygen species via thiol redox systems. *FEBS letters*, 2010, 584(1), pp.213–8.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, 192(2), pp.553–60.
- Kitamura K, Kangawa K, Kojima M, Ichiki Y, Matsuo H, Eto T. Complete amino acid sequence of porcine adrenomedullin and cloning of cDNA encoding its precursor. *FEBS Letters*, 1994, 338(3), pp.306–310.
- Kitamura K, Ichiki Y, Tanaka M, Kawamoto M, Emura J, Sakakibara S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Immunoreactive adrenomedullin in human plasma. *FEBS Letters*, 1994 341(2-3), pp.288–290.
- Klimaschewski L, Kummer W, Heym C. Localization, regulation and functions of neurotransmitters and neuromodulators in cervical sympathetic ganglia. *Microscopy research and technique*, 1996, 35(1), pp.44–68.
- Kocemba KA, van Andel H, de Haan-Kramer A, Mahtouk K, Versteeg R, Kersten MJ, Spaargaren M, Pals ST. The hypoxia target adrenomedullin is aberrantly expressed in multiple myeloma and promotes angiogenesis. *Leukemia*, 2013, 27(8), pp.1729–37.
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108(23), pp.9478–9483.
- Kummer W, Fischer A, Heym C. Ultrastructure of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactive nerve fibres in the carotid body and carotid sinus of the guinea pig. *Histochemistry*, 1989, 92(5), pp.433–9.
- Kummer W, Heym C. Different types of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive neurons in the guinea-pig stellate ganglion as revealed by triple-labelling immunofluorescence. *Neuroscience Letters*, 1991,128(2), pp.187–190.
- Kummer W, Heym C. Neuropeptide distribution in the cervico-thoracic paravertebral ganglia of the cat with particular reference to calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *Cell and tissue research*, 1988, 252(2), pp.463–471.
- Kunz TH, Scott M, Ittner LM, Fischer JA, Born W, Vogel J. Calcitonin gene-related peptide-evoked sustained tachycardia in calcitonin receptor-like receptor transgenic mice is mediated by sympathetic activity. *American journal of physiology*. 2007, 293(4), pp.H2155–60.
- Kuwasako K, Shimekake Y, Masuda M, Nakahara K, Yoshida T, Kitaura M, Kitamura K, Eto T, Sakata T. Visualization of the Calcitonin Receptor-like Receptor and Its Receptor Activity-modifying Proteins during Internalization and Recycling. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(38), pp.29602–29609.

- Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, Wygrecka M, Wilhelm J, Best J, Egemnazarov B, Weisel FC, Osswald SL, Schermuly RT, Olschewski A, Seeger W, Weissmann N, Eickelberg O, Fink L. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The American journal of pathology*, 2012, 181(6), pp.2018–29.
- Langley JN. On the question of commissural fibres between nerve-cells having the same function and situated in the same sympathetic ganglion, and on the function of post-ganglionic nerve plexuses. *The Journal of physiology*, 1904, 31(3-4), pp.244–59.
- Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF, Messlinger K. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *The Journal of comparative neurology*, 2008, 507(3), pp.1277–99.
- Letizia C, Subioli S, Cerci S, Caliumi C, Verrelli C, Delfini E, Celi M, Scuro L, D' Erasmo E. High plasma adrenomedullin concentrations in patients with high-renin essential hypertension. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system*, 2002, 3(2), pp.126–129.
- Li P, Sun HJ, Han Y, Wang JJ, Zhang F, Tang CS, Zhou YB. Intermedin enhances sympathetic outflow via receptor-mediated cAMP/PKA signaling pathway in nucleus tractus solitarii of rats. *Peptides*, 2013, 47, pp.1–6.
- Liao SB, Cheung KH, Cheung MP, To YT, O WS, Tang F. Adrenomedullin increased the short-circuit current in the pig oviduct through chloride channels via the CGRP receptor: mediation by cAMP and calcium ions but not by nitric oxide. *Biology of reproduction*, 2013, 89(4), p.99.
- Lichtenauer M, Zimmermann M, Nickl S, Lauten A, Goebel B, Pistulli R, Yilmaz A, Figulla HR, Ankersmit HJ, Jung C. Transient hypoxia leads to increased serum levels of heat shock protein-27, -70 and caspase-cleaved cytokeratin 18. *Clinical laboratory*, 2014, 60(2), pp.323–8.
- Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF Jr, Lodish HF, Goldring SR. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 1991, 254(5034), pp.1022–4.
- Lisy O, Jougasaki M, Schirger JA, Chen HH, Barclay PT, Burnett JC Jr. Neutral endopeptidase inhibition potentiates the natriuretic actions of adrenomedullin. *The American journal of physiology*, 1998, 275(3 Pt 2), pp.F410–4.
- López-Barneo J. Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 2003, 13(4), pp.493–499.
- Mao D, Yasuda RP, Fan H, Wolfe BB, Kellar KJ. Heterogeneity of nicotinic cholinergic receptors in rat superior cervical and nodose Ganglia. *Molecular pharmacology*, 2006, 70(5), pp.1693–9.
- Marinoni E, Pacioni K, Sambuchini A, Moscarini M, Letizia C, DI Iorio R. Regulation by hypoxia of adrenomedullin output and expression in human trophoblast cells. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 2011, 154(2), pp.146–50.

- Marinoni E, Pacioni K, Sambuchini A, Moscarini M, Letizia C, Di Iorio R. Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M1-subtype. *British journal of pharmacology*, 1989, 98(2), pp.557–73.
- Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Guanqun X, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. *Circulation*, 2004, 109(18), pp.2246–51.
- McDowell G, Coutie W, Shaw C, Buchanan KD, Struthers AD, Nicholls DP. The effect of the neutral endopeptidase inhibitor drug, candoxatril, on circulating levels of two of the most potent vasoactive peptides. *British journal of clinical pharmacology*, 1997, 43(3), pp.329–32.
- McLachlan EM. The formation of synapses in mammalian sympathetic ganglia reinnervated with preganglionic or somatic nerves. *The Journal of physiology*, 1974, 237(1), pp.217–42.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 1998, 393(6683), pp.333–9.
- Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 2009, 56(1), pp.237–46.
- Mimura Y. Phosphate excretion during 24 h of hypoxia in conscious rats. *Acta physiologica Scandinavica*, 1995, 155(3), pp.283–9.
- Molina JM, Cooper GJ, Leighton B, Olefsky JM. Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide. *Diabetes*, 1990, 39(2), pp.260–5.
- Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K. Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney. *Peptides*, 2007, 28(5), pp.1095–103.
- Mukoyama M, Sugawara A, Nagae T, Mori K, Murabe H, Itoh H, Tanaka I, Nakao K. Role of adrenomedullin and its receptor system in renal pathophysiology. *Peptides*, 2000, 22(11), pp.1925–1931.
- Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, Suttorp N, Rosseau S. Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax*, 2010, 65(12), pp.1077–84.
- Nagata D, Hirata Y, Suzuki E, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Ishimitsu T, Minamino N, Ono Y, Kangawa K, Matsuo H, Omata M. Hypoxia-induced adrenomedullin production in the kidney. *Kidney international*, 1999, 55(4), pp.1259–67.
- Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Shirato K, Shibahara S. Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 243(2), pp.514–7.
- Newberry NR, Priestley T. Pharmacological differences between two muscarinic responses of the rat superior cervical ganglion in vitro. *British journal of pharmacology*, 1987, 92(4), pp.817–26.

- Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC. Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia. *FASEB journal*, 2003, 17(11), pp.1499–501.
- Nishi S, Koketsu K. Analysis of slow inhibitory postsynaptic potential of bullfrog sympathetic ganglion. *Journal of neurophysiology*, 1968, 31(5), pp.717–28.
- Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clinical science* 1993, 85(4), pp.385–8.
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM; BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *The New England journal of medicine*, 2004, 350(11), pp.1104–10.
- Pan CS, Yang JH, Cai DY, Zhao J, Gerns H, Yang J, Chang JK, Tang CS, Qi YF. Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2. *Peptides*, 2005, 26(9), pp.1640–6.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods*, 2008, 46(3), pp.143–51.
- Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang CL, Park JI, Gries B, Rafiq A, Faulhammer P, Goldenberg A, Papadakis T, Noll T, Hsu SY, Weissmann N, Kummer W. Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *American journal of physiology*. 2009, 297(5), pp.L837–45.
- Pittner RA, Albrandt K, Beaumont K, Gaeta LS, Koda JE, Moore CX, Rittenhouse J, Rink TJ. Molecular physiology of amylin. *Journal of cellular biochemistry*, 1994, 55 Suppl, pp.19–28.
- Qing X, Svaren J, Keith IM. mRNA expression of novel CGRP1 receptors and their activity-modifying proteins in hypoxic rat lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2001, 280(3), pp.L547–54.
- Ramos CG, Sun X, Johnson EB, Nelson HE, Gonzalez Bosc LV. Adrenomedullin expression in the developing human fetal lung. *Journal of investigative medicine*, 2014, 62(1), pp.49–55.
- Ren YS, Yang JH, Zhang J, Pan CS, Yang J, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Qi YF. Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides*, 2006, 27(1), pp.74–9.
- Ribatti D, Nico B, Spinazzi R, Vacca A, Nussdorfer GG. The role of adrenomedullin in angiogenesis. *Peptides*, 2005, 26(9), pp.1670–5.
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279(8), pp.7264–74.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW,

- Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 1993, 304(5922), pp.129–35.
- Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Iehiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. *FEBS Letters*, 1994, 352(2), pp.105–108.
- Savli H, Gulkac MD, Esen N. The effect of stimulated microglia conditioned media on BDNF gene expression of striatal astrocytes: quantification by real-time PCR. *The International journal of neuroscience*, 2004, 114(12), pp.1601–12.
- Schultzberg M, Hökfelt T, Lundberg JM. Coexistence of classical transmitters and peptides in the central and peripheral nervous systems. *British medical bulletin*, 1982, 38(3), pp.309–13.
- Sena JA, Wang L, Pawlus MR, Hu CJ. HIFs Enhance the Transcriptional Activation and Splicing of Adrenomedullin. *Molecular cancer research*, 2014, 12(5):728-41.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 1962, 59, pp.223–39.
- Soultanova A. Expression and role of peptides of the calcitonin family in alveolar NR8383 macrophages. *Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Giessen* 2015
- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB journal*, 2001, 15(13), pp.2445–53.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 1995, 207(1), pp.25–32.
- Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K. Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides*, 2006, 27(6), pp.1383–9.
- Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Letters*, 2004, 556(1-3), pp.53–58.
- Tallini YN, Shui B, Greene KS, Deng KY, Doran R, Fisher PJ, Zipfel W, Kotlikoff MI. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiological genomics*, 2006, 27(3), pp.391–7.
- Uddman R, Edvinsson L, Jansen I, Stiernholm P, Jensen K, Olesen J, Sundler F. Peptide-containing nerve fibres in human extracranial tissue: a morphological basis for neuropeptide involvement in extracranial pain? *Pain*, 1986, 27(3), pp.391–399.
- Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Clark RK, Willette RN, Sulpizio AC, Aiyar NV, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(25), pp.11480–4.
- Waskova-Arnostova P1, Kasparova D, Elsnicova B, Novotny J, Neckar J, Kolar F, Zurmanova J. Chronic hypoxia enhances expression and activity of mitochondrial creatine kinase and hexokinase in the rat ventricular myocardium. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 2014, 33(2), pp.310–20.
- Weichselbaum A, Stangl E. Zur Kenntnis der feineren Veränderungen des Pankreas bei Diabetes mellitus. *Wien Klinisches Wochenschriften*, 1901, 14, pp.968–972.
- Weissmann N1, Manz D, Buchspies D, Keller S, Mehling T, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Gassmann M, Grimminger F. Congenital erythropoietin over-expression causes “anti-pulmonary hypertensive” structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia. *Thrombosis and haemostasis*, 2005, 94(3), pp.630–8.
- Westerhaus M, Loewy A. Central representation of the sympathetic nervous system in the cerebral cortex. *Brain Research*, 2001, 903(1-2), pp.117–127.
- Westermarck P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *The American journal of pathology*, 1987, 127(3), pp.414–7.
- Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Hörstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal* 2003, 17(2), pp.271–3.
- Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, Lundberg JM, Forssmann WG, Reinecke M, Tschopp FA, Fischer JA. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neuroscience Letters*, 1984, 52(1-2), pp.199–204.
- Xu Y, Krukoff TL. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide. *American journal of physiology*. 2004, 287(4), pp.R729–34.
- Yamamoto K, Senba E, Matsunaga T, Tohyama M. Calcitonin gene-related peptide containing sympathetic preganglionic and sensory neurons projecting to the superior cervical ganglion of the rat. *Brain Research*, 1989, 487(1), pp.158–164.
- Yan SF, Zou YS, Gao Y, Zhai C, Mackman N, Lee SL, Milbrandt J, Pinsky D, Kisiel W, Stern D. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(14), pp.8298–303.
- Yang JH, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Ouyang M, Yang J, Chang JK, Tang CS, Qi YF. Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 327(3), pp.713–9.
- Yang JH, Qi YF, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Yang J, Chang JK, Tang CS. Protective effects of

- intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides*, 2005, 26(3), pp.501–7.
- Yasuhara O, Aimi Y, Matsuo A, Kimura H. 2008. Distribution of a splice variant of choline acetyltransferase in the trigeminal ganglion and brainstem of the rat: comparison with calcitonin gene-related peptide and substance P. *The Journal of comparative neurology*, 509(4), pp.436–48.
- Yin X, Cui W, Hu G, Wang H. Desensitization of alpha7 nicotinic receptors potentiated the inhibitory effect on M-current induced by stimulation of muscarinic receptors in rat superior cervical ganglion neurons. *Journal of neural transmission* 2005, 112(9), pp.1133–48.
- Zaidi ZF, Matthews MR. Source and origin of nerve fibres immunoreactive for substance P and calcitonin gene-related peptide in the normal and chronically denervated superior cervical sympathetic ganglion of the rat. *Autonomic Neuroscienc*, 2013, 173(1-2), pp.28–38.
- Zhang M, Zhong H, Vollmer C, Nurse CA. Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *The Journal of physiology*, 2000, 525 Pt 1, pp.143–58.
- Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F. Adrenomedullin and cancer. *Regulatory Peptides*, 2003, 112(1-3), pp.175–183.
- Zumpe ET, Tilakaratne N, Fraser NJ, Christopoulos G, Foord SM, Sexton PM. Multiple ramp domains are required for generation of amylin receptor phenotype from the calcitonin receptor gene product. *Biochemical and biophysical research communications*, 2000, 267(1), pp.368–72.

11 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, Jurastow I, Wessels L, Wolff M, Schütz B, Weihe E, Chubarov V, Gudermann T, Klein J, Bschleipfer T, Kummer W. Bitter Triggers Acetylcholine Release from Polymodal Urethral Chemosensory Cells and Bladder Reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 3;111(22): pp.8287-92
- Graulich T, Das SK, Krasteva G, Ruppert C, Wessels L, Hoefler G, Mühlfeld C. Cancer Cachexia Alters Intracellular Surfactant Metabolism but not total Alveolar Surface Area. *Histochemistry and Cell Biology*, 2012,138 (5): pp.803–13.
- Graulich T, Das SK, Wessels L, Kummer W, Hoefler G, Mühlfeld C. Effects of Lewis Lung Carcinoma and B16 Melanoma on the Innervation of the Mouse Trachea. *Autonomic Neuroscience*, 2014, pp.106-10.
- Krasteva G, Hartmann P, Papadakis T, Bodenbenner M, Wessels L, Weihe E, Schütz B, Langheinrich AC, Chubarov V, Gudermann T, Ibanez-Tallon I, Kummer W. Cholinergic Chemosensory Cells in the Auditory Tube. *Histochemistry and Cell Biology* 2012, 137 (4): pp.483–97.

Abstracts

- Graulich T, Das SK, Wessels L, Kummer W, Hoefler G, Muehlfeld C. Differential effect of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma on tracheal innervation in mice. *Onkologie* 2013, 36, p.267
- Graulich T, Das SK, Krasteva G, Wessels L, Ruppert C, Kummer W, Mühlfeld C. Tracheal innervation and alveolar epithelial type II cell lamellar bodies are reduced in the cancer cachectic mouse. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185, A3552.
- Krasteva G, Hartmann P, Wessels L, Canning BJ, Papadakis T, Kotlikoff MI, Kummer W. Cholinergic chemosensory cells in the respiratory epithelium sense the luminal microenvironment. *Pneumologie*, 2012, 66(06), p.807.
- Paddenberg R, Diehl J, Gries B, Wessels L, Pfeil U, Kummer W. GPR91 and GPR99 in murine sympathetic and sensory neurons. *Autonomic Neuroscience*, 2013, 177(1), p.35.
- Wessels L, Pfeil U, Faulhammer P, Kummer W. Preganglionic Input Drives Upregulation of adrenomedullin/adrenomedullin2 in Murine Principal Sympathetic Neurons. *Autonomic Neuroscience*. 2011,163(1), p.70
- Wessels L, Pfeil U, Faulhammer P, Weissmann N, Kummer W. Expression und Regulation des Adrenomedullinsignalwegs in postganglionären sympathischen Neuronen der Maus 28. *Arbeitsstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg*, 2011, DOI 10.3337/anatges.2011.0014

Kongressbeiträge (nicht publiziert)

- Bender M, Wessels L, Reinges M, Schulz D, Uhl E. Eine initiale Erhöhung des Troponin I hat keine Auswirkung auf die kardio-pulmonale Therapie in den ersten 24 Stunden nach nicht-traumatischer Subarachnoidalblutung. *13.Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv und Notfallmedizin*, 2013, Dresden
- Graf K, Wessels L, Stein M, Kolodziej M, Uhl E, Reinges M. Infection rates in patients with different types of external ventricular drainage – a retrospective analysis. *31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für NeuroIntensiv- und Notfallmedizin*, 2014, Hannover
- Wanis FA, Wessels L, Reinges M, Uhl E, Jödicke A. Assessment & Optimization of the Integration of Ultrasonography into Neuronavigation. *65. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie*, 2014, Dresden

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Lars Wessels

13 Danksagung

Am Ende der vielen Jahre die hinter diesen Seiten stehen sind es viele denen mein Dank gilt. Ich möchte an dieser Stelle versuchen diese Menschen zu erwähnen, auch wenn die Gefahr groß ist den einen oder anderen, der mich auf meinem Weg begleitet hat zu vergessen, hierfür möchte ich vorab um Nachsicht bitten.

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung des Themas danken, darüber hinaus für die gute Betreuung und die Hartnäckigkeit mit der er mich während der langen Zeit auf dem rechten Kurs gehalten hat.

Dr. Uwe Pfeil und Petra Mermer gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung in allen technischen Fragen und dafür, dass Ihr immer ein offenes Ohr für meine Probleme hattet.

Herrn Prof. Dr. Christian Mühlfeld und Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ möchte ich danken für eine offene Tür und viele freundschaftliche Ratschläge „erwachsener“ Wissenschaftler die mir viel Mut gemacht haben.

Mein Dank gilt ebenso den vielen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe kardiopulmonale Neurobiologie und des anatomischen Instituts. Frau Tamara Papadakis, Herrn Martin Bodenbenner-Türich, Frau Silke Wiegand, Frau Dr. Renate Paddenberg, Frau Patrizia Berger Herrn Dr. Amir Rafiq, meinen Mitdoktoranden Aichurek Soultanova und Innokentij Jurastow.

Ariane Weitz Danke ich für viele lustige Stunden und gute Gespräche auch außerhalb des Labors.

Tilman Graulich gebührt ein besonderer Dank, für eine treue wundervolle Freundschaft die auch in schwierigen Zeiten immer Bestand hatte und für die vielen guten und schlechten Stunden zusammen in der Anatomie und außerhalb.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken und hier vor allen Dingen meinen Eltern ohne die all das nicht möglich gewesen wäre. Danke das ihr so seid wie ihr seid.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6521-8

